

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年11月13日 (13.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/092738 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 47/48, 35/76, 48/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/05527
- (22) 国際出願日: 2003年4月30日 (30.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-129026 2002年4月30日 (30.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 榊原 裕幸 (SAKAKIBARA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 原 裕人 (HARA, Hiroto) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 上田 泰次 (UEDA, Yasuji) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 長谷川 護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 游 軍 (YOU, Jun) [CN/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG- OR GENE-CARRIER COMPOSITION HAVING LOWERED HEMAGGLUTININ ACTIVITY

(54) 発明の名称: ヘマグルチニン活性を低下させた薬剤または遺伝子運搬組成物

(57) Abstract: It is intended to provide a drug- or gene-carrier composition having a lowered hemagglutinin activity. A drug- or gene-carrier composition having a lowered hemagglutinin activity (compared to the case without the addition) can be successfully constructed by adding a compound to an envelope protein having a hemagglutinin activity of a minus strand RNA virus. For example, a virus vector provided in an embodiment shows significantly lowered erythrocyte agglutination activity and hemolytic activity and thus the stability of the vector in blood is remarkably elevated. The drug- or gene-carrier composition thus provided can be adequately used in transferring a drug or a gene into a living body.

(57) 要約: 本発明は、ヘマグルチニン活性を低下させた薬剤または遺伝子運搬組成物を提供する。マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に化合物を付加させることにより、該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性を低下させた薬剤または遺伝子運搬組成物を製造することに成功した。例えば本発明の一態様において提供されるウイルスベクターは、赤血球凝集活性および溶血活性が有意に低下しており、血中でのベクターの安定性が顕著に上昇した。本発明により提供される薬剤または遺伝子運搬組成物は、生体内への薬剤または遺伝子の導入に好適に用いられる。

WO 03/092738 A1

BEST AVAILABLE COPY

## 明細書

ヘマグルチニン活性を低下させた薬剤または遺伝子運搬組成物

### 技術分野

本発明は、マイナス鎖RNAウイルスのエンベロープ蛋白質を修飾することにより、ヘマグルチニン活性を低減させた、細胞内への薬物または遺伝子運搬体に関する。

### 背景技術

センダイウイルス (SeV) のエンベロープ蛋白質はヘマグルチニン (HN) とフュージョン (F) の2種類から構成される。SeVはHN蛋白質が細胞表面のシアル酸に結合した後、F蛋白による融合により、細胞質内へ直接、短時間に、かつ高効率で感染することが可能である。また、シアル酸はほとんどの細胞表面に存在するため、広範囲の細胞への感染が可能である。このような、優れた感染特性を有するSeVは遺伝子治療を目的に、種々の遺伝子を搭載した組替えSeVベクターとしての開発や (Shiotani et al., Gene Therapy, 2001, 8, 1043-1050)、そのエンベロープ蛋白質を含むリポソーム内水相に遺伝子や種々の薬物を封入した、薬物送達システムとしての研究も進められている (Ramani et al., FEBS Letters, 1997, 404, 164-168; Isaka et al., Experimental Nephrology, 1998, 6, 144-147)。

このように、SeVベクターは多くの利点を有しているが、その広範な感染性は本ベクターの欠点にもなる。SeVベクターはシアル酸を大量に含む赤血球とも融合して、強い溶血活性を引き起こすことから安全性の面で改善が望まれる。また、赤血球と融合することは、標的とする細胞に必要な量の薬物を送達できないことを意味しており、血液中で極めて不安定であると言える。そのため、生体内への投与方法は、一時的に血流を止める、あるいは還流法などによる血液を介さずに行

う方法か、血液成分の影響の少ない部位への局所投与に限定されることが予測される。

このような安全性、安定性にかかわる問題を解決するにはHN蛋白質のヘマグルチニン活性を消失または低減して、赤血球との結合を少なくすることが必要である。しかし、ヘマグルチニン活性の消失は、薬物を導入する標的細胞への結合を低下することにもなり、効率が著しく低下することが容易に推測されるので工夫が必要となる。

これまでに、SeVのHN蛋白をジチオスレイトール (DTT) により特異的に還元して、ヘマグルチニン活性を消失させる方法を利用した研究が多数報告されているが、そのほとんどは赤血球への溶血活性を指標にした研究である。例えば、Tomas hiらはFEBS Letters, 1982, 143, (2), 252-256において、SeVをDTTで還元して、そのヘマグルチニン活性を消失させた。そのときに形成されるHN蛋白分子中のSH基に新たに、赤血球を認識する抗体分子を導入することで、再度赤血球への結合能を補い、溶血活性を再び示すことを報告するのみに留まっている。しかも、その融合活性は著しく低下しており、この方法の発展性には疑問が残る。また、Git manらは、Biochemistry, 1985, 24, 2762-2768において、SeVのエンベロープへの化学的な修飾について報告している。ヘマグルチニン活性を消失させることに成功しているが、融合能も同時に完全に消失しており、融合能を付与するには新たに修飾していないエンベロープ蛋白を組み込み、ヘマグルチニン活性を再度もたす必要があると報告している。

細胞を標的とした研究もいくつか報告はされている。例として、BagaiらはJournal of Virology, 1993, 67, (6), 3312-3318において、HNを還元したSeVを界面活性剤で可溶化を行った後、F蛋白のみからなる微粒子を再構成させて、F蛋白の糖鎖特異的な感染を目指した薬物送達システムを提唱している。また、Ramaniらも、FEBS Letters, 1997, 404, 164-168にて、同様のシステムでインビトロにおける遺伝子導入の結果を報告している。この方法論では、確かにヘマグルチニン

活性を消失した上で、標的とする細胞のみに融合させることは可能であるが、HN蛋白と同時にF蛋白も少なからず還元を受けることや再構成の過程でエンベロープ蛋白が完全に粒子に組み込まれず（Ponimaskinら、Virology, 2000, 269, 391-403）、再び得られる運搬体の融合能は低下するために、投与量が多くなることが改善すべき点として挙げられる。また、調製において、ウイルスを大量に必要とすることや界面活性剤の除去が煩雑であること、さらに、再構成される粒子の不均一性など調製方法の面からも改良の余地は大きい。

このように、これまでに、ヘマグルチニン活性を著しく低減させ、かつ細胞への薬剤送達能を維持した、マイナス鎖RNAウイルスのエンベロープ蛋白をベースとした薬物送達システムは知られていない。

#### 発明の開示

本発明は、マイナス鎖RNAウイルス粒子中のエンベロープ蛋白を修飾することで、ヘマグルチニン活性のみを大きく低減させて、細胞内への薬物または遺伝子導入能は維持した運搬体を提供することを課題とする。

薬物や製剤の開発において、望まない作用を軽減させ、目的とする機能を引き出す方法論として、DDS（Drug Delivery System）は重要な技術である。本発明者らは、DDS技術の一つである化学修飾をマイナス鎖RNAウイルスのエンベロープに対して適用することで、赤血球に対する作用を低下させ、細胞への導入能を維持しうることを考えた。そのためには、ヘマグルチニン活性を担うエンベロープ蛋白への選択的修飾を行い、その活性を低減させるとともに、融合に重要なエンベロープ蛋白への影響は可能な限り小さくするのが望ましい。

本発明者らは鋭意検討した結果、ポリエチレングリコール（PEG）などの高分子修飾が赤血球凝集反応を低減させるのに有効であることを見出した。例えばセンダイウイルス（SeV）のエンベロープ蛋白に存在するアミノ基に対して活性化PEGを共有結合させて得られるPEG修飾SeVベクター（図1）は、PEGの反応量に応じて

赤血球凝集反応（HAU）が著しく低下することが明らかとなった。HAUの低下に伴い、標的細胞への感染性も同様に低下することが懸念されたが、修飾ベクターの細胞への遺伝子導入能の低下はHAUの低下度合いに比べて小さく、十分な能力を維持していることを認めた（表1および2）。このとき、PEGの分子量が大きいほど、細胞への遺伝子導入能を高くすることができることを明らかにした。また、PEG修飾ベクターの調製方法も、非常に短時間で容易であった。

PEG修飾SeVベクターの構成蛋白の電気泳動パターンから、HN蛋白量の大幅な減少と、それに代わる新たな高分子の出現を認めた。一方、F蛋白の減少は小さいことから、HN蛋白が優先的にPEG修飾され、F蛋白への結合よりも優位に起こることが示唆された。このことがHAUを大きく低下しつつ、融合能を維持する要因となっていると推測された（図4、15、および16）。

PEG修飾SeVベクターはHAUの低下を反映して、ラット血液に対する溶血活性が著しく低下しており、安全性の面で非常に優れたベクターであることが示された（図2）。また、SeVベクターは血液と接触するとその遺伝子導入能が著しく低下したが、修飾ベクターでは血液処理後も遺伝子導入能を十分に維持していた（図3および20）。このことは、修飾による赤血球との結合を低下させる効果に加えて、補体などの血液中に存在するベクターの活性を不安定化すると考えられる因子に対しての安定化効果も同時に付与できることを示す結果であった。さらに、PEG修飾ベクターが中和抗体存在下においても、実に安定に遺伝子導入可能であったことから（図5および17）、様々な生体成分に対する安定化効果も付与されていると考えられた。

さらに、PEG修飾ベクターのin vivo投与の効果を調べたところ、複数回投与においてPEG修飾ベクターの遺伝子導入効率は未修飾ベクターに比べ明らかに高く、生体内において高い遺伝子導入能を持つことが確認された（図19）。

このように、PEG修飾の条件を適当に選ぶことにより、赤血球とのインタラクションのみを低減させ、細胞へ高い導入能を維持しうることを見出した。

さらに、本発明者らはヘマグルチニン活性を担うエンベロープ蛋白に選択的に結合する物質の一つとして、HN蛋白に対する精製モノクローナル抗体 (MAb) が活性を低下させることから (Miura et al., Exp. Cell Res., 1982, 141, 409-420)、その利用についても検討を行った。MAbで処理したセンダイウイルスベクターは赤血球凝集反応を全く示さず、そのヘマグルチニン活性は完全にブロックされて、細胞への遺伝子導入も認められなかった。そこで、新たに、MAb分子に標的細胞へ結合するリガンド分子を導入したところ、このリガンド結合MAbで処理したセンダイウイルス (図5) は、赤血球凝集反応や溶血活性は示さなかったにもかかわらず (図7、10、および11)、リガンドが結合しうる標的細胞に対しては遺伝子を高効率に導入し得た (図8および9)。標的細胞以外には遺伝子導入ができなかったことや、過剰の競合物質存在下で遺伝子導入能が消失したことから (表4)、修飾ベクターのヘマグルチニン活性が完全に消失しているにもかかわらず、標的とする細胞にのみ高効率で遺伝子導入が可能となることを裏付ける結果を得た。

組み込むリガンド分子をターゲットとする細胞に高発現しているレセプターに応じた分子に変更することで、種々の細胞に対して導入可能なシステムになると考えられる。

また、このシステムは、使用直前に混和することで容易に調製できるため、非常に使いやすいシステムであることも特徴としてあげられる。

このような技術はSeVのエンベロープ構成蛋白から再構成した微粒子製剤にも適用できる。この場合、先述したようなHN蛋白を還元する必要はなくなると考えられる。SeVを還元せずにそのまま可溶化を行い、必要な薬物を封入した微粒子を再構成させた後、この技術を適用すれば、還元によるF蛋白への影響を与えることなく、より融合能の高い運搬体が形成されることが考えられる。

本発明は、ヘマグルチニン活性が低減した薬剤または遺伝子運搬組成物に関し、より具体的には、

(1) マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む、薬剤または遺伝子運搬組成物であって、(a) 該蛋白質に化合物が付加されており、(b) 該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性が低下しており、(c) 該薬剤または遺伝子を標的とする細胞へ導入する能力を有する、組成物、

(2) さらに(d) 該化合物が付加されていない場合に比べ赤血球に対する溶血活性が低下している、(1)に記載の組成物、

(3) 該組成物が、該マイナス鎖RNAウイルスの感染性ウイルス粒子を含む組成物である、(1)または(2)に記載の組成物、

(4) 該組成物が、該マイナス鎖RNAウイルスの不活化ウイルスまたは該ウイルスのエンベロープの部分を含む、(1)または(2)に記載の組成物、

(5) 該マイナス鎖RNAウイルスが、パラミクソウイルス科ウイルスである、(1)から(4)のいずれかに記載の組成物、

(6) 該パラミクソウイルス科ウイルスが、センダイウイルスである、(5)に記載の組成物、

(7) 該蛋白質に付加されている化合物が分子量1,800以上である、(1)から(6)のいずれかに記載の組成物、

(8) 該蛋白質に付加されている化合物が分子量4,500以上である、(7)に記載の組成物、

(9) 該蛋白質に付加されている化合物が分子量16,000以上である、(8)に記載の組成物、

(10) 該蛋白質に付加されている化合物がポリエチレングリコールである、(1)から(9)のいずれかに記載の組成物、

(11) 該蛋白質が、さらにポリエチレンジアミンと共に複合体を形成している、

(1)から(10)のいずれかに記載の組成物、

(12) 該蛋白質が、細胞に結合する化合物と共に複合体を形成している、(1

- ) から (11) のいずれかに記載の組成物、
- (13) 該細胞に結合する化合物が、該蛋白質に付加されている化合物と結合している、(12) に記載の組成物、
- (14) 該蛋白質に付加されている化合物が、該蛋白質に結合する抗体またはその断片である、(12) または (13) に記載の組成物、
- (15) 該細胞に結合する化合物が、細胞表面の受容体のリガンドである、(12) から (14) のいずれかに記載の組成物、
- (16) 該リガンドが葉酸である、(15) に記載の組成物、
- (17) マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に結合する抗体またはその断片であって、細胞に結合する化合物が結合している抗体またはその断片、
- (18) 抗体またはその断片がF(ab')<sub>2</sub>である、(17) に記載の抗体またはその断片、
- (19) 細胞に結合する化合物が細胞表面の受容体のリガンドである、(17) または (18) に記載の抗体またはその断片、
- (20) 該リガンドが葉酸である、(19) に記載の抗体またはその断片、
- (21) (a) マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に結合する抗体またはその断片であって、細胞に結合する化合物が結合している抗体またはその断片、および (b) 該エンベロープ蛋白質を含む薬剤または遺伝子運搬組成物、を含む薬剤または遺伝子運搬キット、を提供するものである。

本発明は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む薬剤または遺伝子運搬組成物であって、(a) 該蛋白質に化合物が付加されており、(b) 該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性が低下しており、(c) 該薬剤または遺伝子を標的とする細胞へ導入する能力を有する組成物を提供する。本発明の組成物は、マイナス鎖RNA



ウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む複合体である。このような複合体は、例えば感染性ウイルス粒子であってもよいし、不活化したマイナス鎖RNAウイルス、または例えば再構成リポソームなどのマイナス鎖RNAウイルスの破砕物のエンベロープ成分を含む複合体であってもよい。

感染性ウイルス粒子は、細胞への感染を介して該細胞内にウイルスに含まれる薬物または遺伝子を細胞内に運搬する。特にウイルスゲノムに外来遺伝子を組み込むことにより、感染性ウイルス粒子が感染した細胞内においてウイルスゲノムから該遺伝子を発現させることができる。感染性ウイルスは、複製能を有する (replication competent) ウイルスであってもよく、あるいは複製能を有さない (replication deficient) ウイルスであってもよい。複製能を有するウイルスとは、該ウイルスが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

マイナス鎖RNAウイルスは、細胞内において該ウイルスのゲノムRNAを、このゲノムRNAの転写および複製に必要なウイルス蛋白質の共存下で転写させることにより再構成させることができる。組み換えマイナス鎖RNAウイルスの再構成は公知の方法を利用して行うことができる (国際公開番号 W097/16539; 国際公開番号 W097/16538; 国際公開番号 W000/70055; 国際公開番号 W000/70070; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al.,

1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。  
これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。

外来遺伝子を含む組換えウイルスベクターは、ウイルスベクターゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、標的とする細胞において発現させたい所望の遺伝子を用いることができる。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、また天然型蛋白質と同等の機能を有する蛋白質をコードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。あるいは、天然型蛋白質の欠失型や人工的な蛋白質などであってもよい。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、ウイルスベクターの鋳型となるDNA（ウイルスベクターDNA）に対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入し、これを転写させてウイルスの再構成を行う。ウイルスベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスベクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい（Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830）。パラミクソウイルス等においては、外来遺伝子は、ウイルスの各蛋白質のオープンリーディングフレーム（ORF）（例えばNP、P、M、F、HN、およびL蛋白質のORF）の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S配列（転写開始配列—介在配列—転写終結配列）またはその部分を挿入し、各遺伝子の間にE-I-S配列のユニットが配置されるようにする。

回収したウイルスは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法は濾過、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実

質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。マイナス鎖RNAウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

不活化したウイルスまたは破砕ウイルスの再構成生成物は、細胞に薬物または遺伝子を導入するためのトランスフェクション試薬として用いられる。マイナス鎖RNAウイルスの不活化は、例えばUV照射により行うことができる。また、HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan)-リポソームなど、不活化ウイルスを用いたリポソームの製造方法は、例えば震盪と超音波により調製することができる（「ライフサイエンスにおけるリポソーム／実験マニュアル」シュプリングー・フェアラーク東京（1992）pp. 282～287参照）。また不活性化したセンダイウイルス粒子、またはリポソーム及び核酸を混合した組成物（膜融合リポソーム）が報告されている（金田安史：BIOTHERAPY, 8, 1265(1994)）。あるいは破砕ウイルスの再構成は、例えば、ウイルス可溶化物からリポソームを再構成させ、いわゆるビロソーム (virosome) を調製することにより実施できる (Bagai et al., 1993, Biochem. Biophys. Acta 1152, 15-25)。具体的には、マイナス鎖RNAウイルスを Triton X-100 などの界面活性剤で可溶化した後、不溶性のRNPを遠心除去する。エンベロープおよびエンベロープ蛋白質を含む可溶化液から界面活性剤を除くことにより粒子を再構成させ、ビロソームを調製することができる。ビロソームは粒子径を均一化するために、遠心分離（例えば12000rpm, 10分）により粒子サイズが揃ったビロソームを分離して回収することができる。

感染性ウイルス粒子を含む組成物においては、その感染性ウイルス粒子は、マ

イナス鎖RNAウイルスであってもよく、あるいはマイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を持つ別のウイルスであってもよい。異種ウイルスのエンベロープ蛋白質でシュードタイプ化されたウイルスはよく知られている（国際公開番号 W001/92508）。マイナス鎖RNAウイルスのエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスを調製するには、例えば、マイナス鎖RNAウイルスの不活化ウイルスまたは該ウイルスのエンベロープ蛋白質を持つピロソームなどを調製し、これを他のウイルスに融合させることにより製造することができる。あるいは、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を発現する発現ベクターを、他のウイルスのパッケージング細胞で発現させることにより製造することができる。該他のウイルスとしては、例えばレトロウイルスが挙げられ、具体的にはモロニーマウス白血病ウイルス（Moloney Murine Leukaemia Virus; MoMLV）およびマウス幹細胞ウイルス（Murine Stem Cell Virus; MSCV）などを含むオンコウイルス亜科（Oncovirus）に属するレトロウイルス（本発明においてオンコウイルスと呼ぶ）、およびヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus; HIV）（例えばHIV1またはHIV2）、サル免疫不全ウイルス（simian immunodeficiency virus; SIV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、マエディ・ビスナウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ヤギ関節脳炎ウイルス（CAEV）などを含むレンチウイルス亜科（Lentivirus）に属するレトロウイルス（本発明においてレンチウイルスと呼ぶ）が挙げられる。HIV-1としては、全てのメジャー（M）サブタイプ（AからJを含む）、Nおよび outlier（O）が含まれる（Hu, D. J. et al., JAMA 1996; 275: 210-216; Zhu, T. et al., Nature 1998, 5; 391(6667): 594-7; Simon, F. et al., Nat. Med. 1998, 4(9): 1032-7）。SIV単離株としては、SIVagm、SIVcpz、SIVmac、SIVmnd、SIVsnm、SIVsyk等が例示できる。また、スプーマウイルス（Spumavirus）に由来するレトロウイルスなどであってもよく、例えばフォーミーウイルス（Foamyvirus）が含まれる（DE4318387; W09607749; Virology (1995) 210, 1, 167-178; J. Virol.

(1996) 70, 1, 217-22)。フォーミーウイルスに由来するウイルスベクターは、ヒト細胞への外来遺伝子導入、特に遺伝子治療および組換えワクチンの投与などに利用され得る。

シュードタイプウイルスベクターは、例えばマイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に加えて、該ウイルスの他のエンベロープ蛋白質をさらに含むことができる。例えば、パラミクソウイルスのHNおよびF蛋白を持つシュードタイプウイルスベクターで、HN蛋白質に化合物が付加されたベクターを含む組成物は、本発明に含まれる。またマイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を含むウイルスベクターは、他のウイルス由来のエンベロープ蛋白質をさらに含むことができ、例えばこのような蛋白質として、ヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロープ蛋白質が好適である。このような蛋白質としては、特に制限はないが、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質、水疱性口内炎ウイルス (VSV) のG蛋白質などが挙げられる。また、ヘルペスウイルス科の蛋白質としては、例えば単純ヘルペスウイルスのgB、gD、gH、gp85蛋白質、EBウイルスのgp350、gp220蛋白質などが挙げられる。ヘパドナウイルス科の蛋白質としては、B型肝炎ウイルスのS蛋白質などが挙げられる。レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばマウス白血病ウイルス (MuLV) 4070A株由来のエンベロープ蛋白質を用いることができる。また、MuMLV 10A1由来のエンベロープ蛋白質を用いることもできる (例えばpCL-10A1 (Imgenex) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996))。エコトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばモロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV) 由来のエンベロープ蛋白質を用いることができる。水疱性口内炎ウイルスG蛋白 (VSV-G) としては、例えば Indiana血清型株 (J. Virology 39: 519-528 (1981)) 由来の蛋白を用いることができる。これら以外にも、所望の株由来の蛋白質を用いることができる。

本発明においてマイナス鎖RNAウイルスとは、マイナス鎖 (ウイルス遺伝子をコ

ードするセンス鎖に対するアンチセンス鎖)のRNAをゲノムとして含むウイルスであって、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有するウイルスを言う。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖とも呼ばれる。マイナス鎖RNAウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。

本発明においてヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質は、好ましくは一本鎖マイナス鎖RNAウイルスのウイルスエンベロープ蛋白質である。一本鎖マイナス鎖RNAウイルスは非分節型(non-segmented)マイナス鎖RNAウイルスとも言われ、パラミクソウイルス(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス(Filoviridae)、オルトミクソウイルス(Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses属等を含む)、ブニヤウイルス(Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス(Arenaviridae)などの科に属するウイルスが含まれる。ヘマグルチニン活性を持つエンベロープ蛋白質としては、具体的には、パラミクソウイルスのHN蛋白質、オルトミクソウイルスのHA蛋白質、インフルエンザウイルスのHA蛋白質、ブニヤウイルスのG1蛋白質、ラブドウイルスのG蛋白質、フィロウイルスのVP1蛋白質などが挙げられる。

本発明においてヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質は、さらに好ましくはパラミクソウイルスのウイルスエンベロープ蛋白質である。「パラミクソウイルス」とは、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)に属するウ

ウイルスを指す。パラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス (Paramyxovirus) 属、モルビリウイルス (Morbillivirus) 属、およびルブラウイルス (Rubulavirus) 属、ニューモウイルス (Pneumovirus) 属、およびメタニューモウイルス (Metapneumovirus) 属が含まれ、具体的にはセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型等が挙げられる。パラミクソウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質は、具体的にはHN蛋白質が挙げられる (H蛋白質とも言われる)。本発明においてヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質は、さらに好ましくはパラミクソウイルス属、モルビリウイルス属、およびルブラウイルス属を含むパラミクソウイルス亜科のウイルスであり、さらに好ましくはパラミクソウイルス属ウイルスのウイルスエンベロープ蛋白質である。ヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質は、最も好ましくはセンダイウイルスのHN蛋白質である。各ウイルスは、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などが含まれる。例えばZ株由来のセンダイウイルスのHN蛋白質を好適に用いることができる。センダイウイルスのHN遺伝子の塩基配列は、GenBankアクセッション番号 D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131 などに記載されている。

また、ウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質として、オルトミクソウイルス科ウイルスのHA蛋白質を用いることも好ましい。例えば、インフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白発現プラスミドを用いて製造されたシールドタイプウイルスは、ヒト細胞を含めた広い哺乳動物細胞に感染可能である。インフルエンザウイルスエンベロープには所望の単離株由来のものが用いられ得る。インフルエンザウイルスのbuddingにおいては、ノイラミニダーゼがシアル

酸との結合を切断する役割を担っている。このため、HAシュードタイプウイルスの作製においては、HAに化合物を付加した前、中、または後の時期にノイラミニダーゼで処理することで感染性ウイルスを得ることができる。あるいは、ノイラミニダーゼ活性を有する蛋白質を共存させたウイルスベクターを作製することによって、自動的にシアル酸との結合を切断させることができる。この場合、パラミクソウイルスのHN蛋白質などの、ノイラミニダーゼ活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質を用いることが特に好適である。このように本発明は、オルトミクソウイルス科ウイルスのHAとパラミクソウイルス科ウイルスのHN蛋白質の両方でシュードタイプ化されたウイルスベクターで、これらのいずれかまたは両方に化合物が付加されており、ヘマグルチニン活性が低下したウイルスを含む組成物を提供する。

ウイルスエンベロープ蛋白質は、野生型ウイルスが持つインタクトな蛋白質であつてもよいし、天然または人為的に変異が導入されていてもよい。例えば、これらのエンベロープ蛋白質において細胞表面の抗原分子となりうる抗原提示エпитープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めた蛋白質を用いてウイルスを作成することも可能である。また、病原性ウイルス等における弱毒株由来のエンベロープ蛋白質などを用いることもできる。

例えば、ヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質や、他のエンベロープ蛋白質の細胞質側領域を欠失、置換、および/または付加により改変した蛋白質を用いて、より高い遺伝子導入能を有するベクターを製造することが可能である。本発明は、天然に存在するヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質の細胞質側領域の一部または全部が、置換、欠失、および/または付加により改変された蛋白質を含むウイルスであつて、ヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質に化合物が付加されているベクターを含む組成物に関する。具体的には、例えばパラミクソウイルスのHN蛋白質の細胞質側領域を欠失させたり、他の膜蛋白質（例えばレンチウイルスを含むレトロウイルスの



エンベロープ蛋白質)の細胞質側領域で置換または付加した改変蛋白質は、感染効率の高いシュードタイプレトロウイルスベクターを製造するために好適に用いられる。

本発明においてヘマグルチニン活性とは、ヘマグルチネーション (Hemagglutination, HA) を起こす活性、すなわち赤血球を凝集させる活性を言う。ヘマグルチニン活性は公知の方法により試験することができる (国立予防衛生研究所学友会編, 改訂二版 ウイルス実験学 総論, pp. 214-225, 丸善株式会社)。赤血球としては、例えばニワトリ (ヒヨコおよび成鶏を含む)、ガチョウ、ラット、モルモット、アカゲザル、ミドリザル、またはヒトなどの赤血球が用いられ得る。反応温度は、0℃、4℃、室温、または37℃など、蛋白質により適した条件で行う。具体的には、ヘマグルチニン活性の測定は、例えば「endo-point 希釈法」 (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999) により実施することができる。

本発明の組成物は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に化合物が付加されており、これにより該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性が低下している。本発明において活性の低下は有意に低下していればよく例えば統計学的に有意 (例えば有意水準5%またはそれより有意) に低下している場合が含まれる。また活性が完全に欠失 (または検出限界未満) している場合も含まれる。本発明の組成物は、該化合物が付加されていない場合の対照組成物と比べ、ヘマグルチニン活性が好ましくは1/2以下、より好ましくは1/3以下、より好ましくは1/5以下、より好ましくは1/10以下、より好ましくは1/20以下、より好ましくは1/50以下、より好ましくは1/100以下、より好ましくは1/200以下、より好ましくは1/500以下、より好ましくは1/1000以下に

低下している。これに対して本発明の組成物が持つ薬剤または遺伝子を細胞へ導入する能力は、該ヘマグルチニン活性の低下に比べて高く維持されている。すなわち、本発明の組成物が持つ薬剤または遺伝子を細胞へ導入する能力は、化合物が付加されていない対照組成物の場合と比べ低下の度合いが、該ヘマグルチニン活性の低下の度合いに比べて少ないか、より好ましくは低下していないか上昇している。

また本発明の組成物は、好ましくは溶血活性も有意に低下している。溶血活性は、血液に被検組成物を添加し静置後、遠心して血球成分を除き、溶出したヘモグロビンを吸光度測定により測定して検出することができる（実施例参照）。本発明の組成物は、該化合物が付加されていない場合の対照組成物と比べ、溶血活性が好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下、より好ましくは1/2以下、より好ましくは1/3以下、より好ましくは1/5以下、より好ましくは1/10以下、より好ましくは1/20以下、より好ましくは1/50以下に低下している。

本発明の組成物は、ヘマグルチニン活性が低下しており、好ましい態様においては溶血活性も低下しているが、薬剤または遺伝子を細胞に導入する能力を保持している。例えばマイナス鎖RNAウイルス、あるいは該ウイルスのエンベロープ成分を含む組成物においては、該組成物は標的細胞との細胞膜融合能を有しており、これにより薬剤または遺伝子を標的細胞に送達される。細胞膜融合能とは、本発明の組成物に含まれる複合体（運搬体）が細胞膜に吸着した後、該複合体の持つ融合活性により、細胞内にその構成成分が組み込まれる能力を言う。この活性は、マイナス鎖RNAウイルスのエンベロープに含まれる、細胞融合を起こすエンベロープ蛋白質であるフュージョン（F）蛋白質の働きによる。本発明の組成物に含まれる細胞膜には、化合物が付加されたヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に加え、好ましくはマイナス鎖RNAウイルスのF蛋白質も含んでいる。

細胞との融合能は、例えば、1. 赤血球の溶血を指標として検出する。2. 膜に蛍光物質を組み込んでおき、融合による膜の流動により蛍光物質が希釈され蛍

光強度の変化が起きることを利用して検出する。あるいは3. 内水層に薬物を封入したりポソームを細胞膜のモデルとして、その漏出を指標として検出する、などの方法により検出することができる。

また、上記のようにレトロウイルスなど他のウイルスにおけるシュードタイプウイルスとして本発明の組成物を調製する場合は、それぞれのウイルスのエンベロープ蛋白質により、ウイルス内の薬剤または遺伝子が細胞に導入される能力が保持されている。薬物または遺伝子の細胞への導入能力は、細胞内に導入されたこれらの薬剤または遺伝子を検出することにより確認することができる。薬剤であれば、例えば標識された薬剤の細胞内への取り込みを検出したり、あるいは生理活性物質を取り込ませ、これによる細胞の形質の変化を検出することによって検出することができる。遺伝子であれば、細胞内における該遺伝子の発現を、RT-PCR、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、免疫沈降、ウェスタンブロット等の方法によりRNAレベルまたは蛋白質レベルで検出することができる。また、生理活性蛋白質をコードする遺伝子を取り込ませ、該蛋白質による細胞の形質の変化を検出することによって検出することができる。

また本発明の組成物は、好ましくは血中安定性が有意に上昇している。血中安定性の上昇とは、本発明の組成物が血中に置かれたときに、薬剤または遺伝子の運搬能力の低下の度合いが小さくなることを言う。運搬能力の低下が少ないほど血中安定性は高い。血中安定性の上昇は、本発明の組成物を血液と共にインキュベートし、その後の該組成物の薬剤または遺伝子の運搬を測定し、化合物が付加されていない場合の対照組成物と比べることにより知ることができる（実施例参照）。運搬能力は、例えば薬剤であればその薬剤の活性の大きさであってよく、遺伝子であればその遺伝子の発現レベルであってよい。遺伝子の発現は、例えば転写産物（mRNA）または翻訳産物（蛋白質）を直接または間接に検出することにより決定することができる。生理活性を持つ蛋白質の検出は、その蛋白質の活性の測定により行うことができる。本発明の組成物は、該化合物が付加されていない

場合の対照組成物の運搬能力の低下の度合いと比べ、薬剤または遺伝子の運搬能力の低下の度合いが好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下、より好ましくは1/2以下、より好ましくは1/3以下、より好ましくは1/5以下、より好ましくは1/10以下に縮小している。本発明の組成物は、ヘマグルチニン活性に対する薬剤または遺伝子運搬能力が、未修飾の対照組成物に比べ上昇していることが好ましい。

本発明においてヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に化合物が付加されているとは、該蛋白質と該化合物とが結合していることを言う。結合は共有結合または非共有結合であってよい。非共有結合としては、例えば水素結合、配位結合、イオン結合、疎水相互作用（疎水結合）、および分子間力（ファンデルワールス力）などが挙げられる。該蛋白質と該化合物は、もともとは分離して存在していたが、結合により該化合物が該蛋白質に付加されたものであってよい。ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質への化合物の付加は、例えば架橋による共有結合形成により行うことができる。架橋は、所望の官能基を介して形成させることができる。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、ヒドロキシル基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基、フェノール基等が挙げられるが、これらに制限されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。該蛋白質と該化合物は、好ましくは非ペプチド結合で結合されている。共有結合法としては、臭化シアン活性化法、酸アジド誘導体法、縮合試薬法、ジアゾ法、およびアルキル化法などが挙げられる。

本発明の薬剤または遺伝子運搬組成物の製造は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に化合物を接触させる工程、および該蛋白質と該化合物を結合させる工程を含む方法により実施することができる。化合物は、該エンベロープ蛋白質のエンベロープ外側にあたる領域に結合させる

。このためには、特に、該蛋白質に化合物を接触させる工程を、該蛋白質を含むウイルス粒子に該化合物を接触させることにより行うことが好ましい。これにより、ヘマグルチニン活性に関与する該蛋白質のウイルス表面に露出した領域に特異的に化合物を付加することができる。特に本発明において、ウイルス表面にヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に加え、他のエンベロープ蛋白質が存在する場合でも、化合物の架橋によりヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に優先的に化合物が付加され、有意にヘマグルチニン活性が低下することが判明した。従って、例えば通常通りの方法で生産された、化合物が付加されていないウイルスに化合物を添加し、該化合物を該ウイルスに付加する工程を実施することにより、簡単にヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に化合物が付加されたウイルスを製造することができる。

ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に付加する化合物としては、該蛋白質のヘマグルチニン活性を有意に阻害する限り制限されない。好ましくは有意な生物毒性を持たず、蛋白質に付加された後は化学的に安定な化合物であることが好ましい。また、非抗原性または抗原性が低いことが好ましい。また、付加する化合物は水溶性であることが好ましい。ヘマグルチニン活性を有効に阻害するためには、化合物の分子量は好ましくは1,600（ダルトン；Da）以上、より好ましくは1,800以上、より好ましくは1,900以上、より好ましくは2,000以上である。特に、分子量が2,800以上、より好ましくは3,800以上、より好ましくは4,300以上、より好ましくは4,500以上、より好ましくは5,000以上の化合物である。また分子量が12,000以上、より好ましくは14,000以上、より好ましくは15,000以上、より好ましくは16,000以上、より好ましくは18,000以上、より好ましくは20,000以上の化合物は、ヘマグルチニン活性を特に顕著に阻害することができる。

付加する化合物としては各種のポリマーであってよく、例えば有機化合物重合体が挙げられる。付加する化合物は分子量にばらつきがあってもよく、その場合、本明細書で言う付加する化合物の分子量とは平均分子量である。分子量分散（M

W/Mn) は小さい方が好ましく、例えば5以下、好ましくは3以下、より好ましくは2以下、より好ましくは1.6以下、より好ましくは1.4以下である。

具体的には、天然高分子として、例えば、抗体、アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、フィブリン、レクチン、ヘパリンなどの蛋白質またはその断片、あるいは、デキストラン、シクロデキストリン、硫酸デキストラン、セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸などの多糖類、さらには脂質を用いることができる。また、合成高分子として、ポリ乳酸、ポリリジン、ポリスチレン、ピラン重合体、ポリグルタミン酸、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、スチレン-マレイン酸共重合体、リジン-グルタミン酸共重合体、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、フィコールなどを用いることができる。

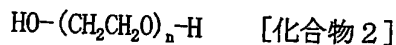
付加する化合物としては、特にポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる (J.M. Harris, "Polyethylene Glycol Chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications", Plenum, New York, NY, 1992; J.M. Harris and S. Zalipsky, "Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol", ACS Books, Washington, D.C., 1997)。PEGは水溶性で毒性が低いまたはないため好適に用いられる。PEGとは、下記の構造を有する化合物を言う。



〔化合物1〕

(ここでnは2以上の自然数)

例えば代表的なPEGとしては、以下の構造からなる化合物が挙げられる。



〔化合物2〕

(ここでnは2以上の自然数)

PEGは所望の修飾体が含まれ、例えば上記構造の末端はヒドロキシル基等から置換されていてもよい。例えば主鎖の一端のヒドロキシル基が置換されたモノメチルエーテル (mPEG) は、本発明において好適に用いられる。PEGは直鎖状であってもよく、あるいは分枝を持つPEGであってもよい。例えば1、2、3、またはそれ以

上の側鎖を有するPEGを用いることができる。側鎖はエチレングリコール構造を有してよい。PEGは各種の分子量のものが入手可能であり、例えばPEG2000（平均分子量 2000）、PEG3000（平均分子量 3000）、PEG4000（平均分子量 4000）、PEG5000（平均分子量 5000）、PEG8000（平均分子量 8000）、PEG10000（平均分子量 10000）、またはPEG20000（平均分子量 20000）などを好適に用いることができる。架橋のための官能基を持つPEGを用いて、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質にこのPEGを付加することができる。

例えば、末端に一級アミノ基を有するPEGは、アシル化試薬で架橋することが可能である (Buckmann, A. et al (1981) Makromol. Chem. 182:1379; Zalipsky, S. et al (1983) Eur. Polym. J. 19:1177; Eidelman, O. et al (1991) Am. J. Physiol. 260 (Cell Physiol 29):C1094; Pillai, V.N.R. et al (1980) J. Org. Chem. 45:5364)。あるいは、N-hydroxysuccinimide (NHS) 活性化エステル、活性化カルボン酸およびアルデヒドなどを利用してより簡便に架橋させることができる。具体的には、PEG カルボン酸のNHSエステル、としては例えば PEG-Succinimidyl succinate、PEG-Succinimidyl carbonate、PEG-Succinimidyl Propionate、および PEG-Succinimidyl Butanoate などが挙げられる (Olson, K. et al, (1997) J. M. Harris & S. Zalipsky Eds., Poly(ethylene glycol), Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, ACS, Washington, DC.; Harris, J. M. and Kozlowski, A., U.S. Patent 5,672,662)。また、PEGのbenzotriazole carbonate 誘導体は、蛋白質のアミノ基と安定なウレタン結合を形成する (Dolence, Eric K., U.S. Patent 5,650,234)。また、アルデヒド基を末端に有するPEGを用いることもできる。アルデヒド基はNHSエステルよりも穏やかな条件でアミンに反応させることができる。たとえば PEG-Propionaldehydeなどを好適に用いることができる (Harris, J.M. et al (1984) J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 22:341; Kinstler, Olaf B. et al., U. S. Patent 5,824,784; Wirth, P. et al (1991) Bioorg. Chem. 19:133)。また PEGのMaleimide誘導体はチオール基に架橋す

ることができる (Goodson, R. J. & Katre, N. V. (1990) Bio/Technology 8:343; Kogan, T. P. (1992) Synthetic Comm. 22, 2417)。PEGのcarboxymethyl-NHS誘導体、norleucine-NHS誘導体、tresylate誘導体、epoxide誘導体、carbonylimidazole誘導体、および PNP carbonate誘導体などを用いることもできる。特に、PEG TresylateおよびPEG Succinimidyl Propionateを好適に用いることができる。

化合物の結合は、例えばヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を含むウイルス粒子を 1mg蛋白/ml 程度の濃度で調製し、付加したい化合物を 0.1~100mg、好ましくは1~50mg程度添加して結合させることができる。例えば、ウイルス 1mg蛋白に対して、pH8.5の緩衝液中で、SPA-PEG5Kを1~5mgを反応させることにより、また、SPA-PEG20Kを10~20mg程度反応させることによりヘマグルチニン活性が有意に低下し、細胞への薬剤または遺伝子導入能を維持させることができる。蛋白質への化合物の付加は、反応に用いる化合物の量などの反応条件により変化し得るが、ヘマグルチニン活性が有意に低下し、細胞への薬剤または遺伝子導入能は維持されるように適宜調整される。

例えばマイナス鎖RNAウイルスに化合物を付加する場合、その化合物とウイルスとの量比は、化合物をモル数、ウイルス量をタンパク量とした場合に 1~10  $\mu$ mol/mg蛋白質 (化合物/ウイルス比)、より好ましくは 2~8  $\mu$ mol/mg蛋白質、より好ましくは 3~8  $\mu$ mol/mg蛋白質、例えば約4  $\mu$ mol/mg蛋白質とすることができる。

薬剤または遺伝子を細胞に導入する能力を失わせないために、付加する化合物の分子量は好ましくは100,000以下、より好ましくは80,000以下、より好ましくは60,000以下、より好ましくは50,000以下である。特に分子量が40,000以下、より好ましくは35,000以下、より好ましくは30,000以下、より好ましくは25,000以下、より好ましくは20,000以下の化合物は該導入能力を維持しヘマグルチニン活性を特異的に低下させるのに好適である。

実施例28に示すように、ヘマグルチニン蛋白質を修飾した場合に薬剤または遺伝子の導入能力は、ポリエチレンジアミン (PEI) などの脂肪族ポリアミンにより



さらに修飾することにより顕著に改善できることが明らかとなった。PEIとは、下記の構造を有する化合物を言う。



(ここでnは2以上の自然数)

例えばマイナス鎖RNAウイルスのPEG修飾物にPEIを付加することにより、遺伝子導入能を有意に上昇させることができる。この場合、PEIとウイルスとの量比は、化合物を重量、ウイルス量をタンパク量とした場合に 0.001~1 (化合物/ウイルス比)、より好ましくは 0.01~0.2、より好ましくは 0.01~0.1 とすることができる。PEIの平均分子量は例えば 25 kDa~750 kDa のものを好適に用いることができるが、これに限定されない。

また、本発明において、ヘマグルチニン蛋白質への化合物の付加により薬剤または遺伝子の導入効率が低下または喪失する場合でも、この蛋白質を含む複合体に、細胞に結合する活性を有する化合物を付加することにより導入効率を維持できることが判明した。これにより、エンベロープ蛋白質に付加する化合物の分子量は制限されずに、本発明の薬剤または遺伝子運搬組成物を調製することが可能となった。本発明は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む、薬剤または遺伝子運搬組成物であって、

(a) 該蛋白質に化合物が付加されており、(b) 該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性が低下しており、(c) 該蛋白質が細胞に結合する活性を有する化合物と共に形成した複合体を含み、(d) 該薬剤または遺伝子を標的とする細胞へ導入する能力を有する、組成物を提供する。ヘマグルチニン活性を阻害して、遺伝子の導入を阻害する化合物を結合した場合も、その化合物にさらにリガンドを組み入れることで、ヘマグルチニン活性を阻害して、遺伝子導入は維持することができる。リガンドとは、細胞表面の受容体に結合し受容体の機能を活性化する化合物である。例えば、抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片(分子量約50kDa)を用いた場合、結合量を少なく調節すれば、ヘマグルチニン活性の残存に応じ

たウイルスベクターの遺伝子導入能を維持することができるが、細胞に結合する活性を有するリガンド（葉酸）を抗体に結合することにより、ヘマグルチニン活性を完全に阻害した場合でも、ベクターの遺伝子導入能を劇的に向上させることが可能である（実施例参照）。

細胞に結合する活性を有する化合物が、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質と共に複合体を形成しているとは、該化合物と該蛋白質が、共有結合または非共有結合により直接または間接（例えば他の化合物を介して）に結合していることを言う。結合は共有結合でも非共有結合でもよい。例えば、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質と細胞に結合する活性を有する化合物とを有する細胞膜を含む組成物などであってよい。細胞に結合する活性を有する化合物は複合体の表面に露出していることが必要であり、例えば該複合体がウイルス粒子であれば、該蛋白質と該化合物がウイルスエンベロープ表面に存在しているものであってよく、該複合体がリポソームであれば、該リポソーム表面に該蛋白質と該化合物が存在しているものであってよい。細胞に結合する活性を有する化合物を該複合体に結合させるには、例えば該化合物を該複合体に含まれる所望のエンベロープ蛋白質に架橋したり、あるいは好ましくはヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に架橋させることができる。架橋は、上記と同様に所望の官能基を利用して形成させることができる。あるいは、該化合物が蛋白質であれば、膜蛋白質としてエンベロープに発現させたり、該複合体に含まれるエンベロープ蛋白質との融合蛋白質として発現させることができる。好ましい態様においては、細胞に結合する活性を有する化合物は、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に付加されている化合物と共有結合または非共有結合により直接結合しているか、あるいは同一の化合物である。本発明は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む、ヘマグルチニン活性が低下した薬剤または遺伝子運搬組成物の製造方法であって、（a）該蛋白質に化合物を接触させる工程、および（b）該蛋白質と該化合

物を結合させる工程を含む方法であり、(i) 該化合物に、細胞に結合する活性を有する化合物を付加する工程をさらに含む方法に関する。工程(i)は、工程(a)の前に行ってもよく、あるいは工程(a)または(b)と同時あるいは(a)と(b)の間、または工程(b)の後に行ってもよい。好ましくは工程(i)は工程(a)の前に行われる。あるいは、予め工程(i)が行われた化合物をマイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に付加してもよい。

細胞に結合する活性を有する化合物としては、細胞表面に結合し、それにより本発明の組成物の薬剤または遺伝子導入を助ける働きを有する限り、所望のものを用いることができる。そのような化合物としては、例えば細胞表面蛋白質に結合する化合物、または細胞表面の糖鎖に結合する化合物などを用いることができる。具体的には、例えばウイルスのエンベロープ蛋白質、あるいは天然または合成のリガンド、ホルモン、または細胞接着因子などが挙げられ、具体的には葉酸、トランスフェリン、エリスロポエチン、抗体、レクチン、ガラクトース、マンノースなどを例示することができる。

中でも、本発明において葉酸は、本発明の組成物に含まれる複合体の薬剤・遺伝子導入能を維持させるのに極めて有効であることが判明した。本発明は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む、薬剤または遺伝子運搬組成物であって、(a) 該蛋白質に化合物が付加されており、(b) 該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性が低下しており、(c) 該蛋白質が葉酸と共に形成した複合体を含み、(d) 該薬剤または遺伝子を標的とする細胞へ導入する能力を有する、組成物を提供する。特に、該蛋白質に付加されている化合物に葉酸が直接結合していることが好ましい。

細胞に結合する活性を有する化合物を用いて本発明の組成物を製造する際に、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に付加する化合物として特に好

ましいのは該蛋白質に結合する抗体である。本発明の組成物は、好ましい態様として、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に結合する抗体またはその断片が結合している該蛋白質を含む組成物であって、該蛋白質が、細胞に結合する活性を有する化合物と共に複合体を形成している組成物が挙げられる。すなわち本発明は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む、薬剤または遺伝子運搬組成物であって、(a) 該蛋白質に、該蛋白質に結合する抗体またはその断片が結合しており、(b) 該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性が低下しており、(c) 該蛋白質が細胞に結合する活性を有する化合物と共に形成した複合体を含み、(d) 該薬剤または遺伝子を標的とする細胞へ導入する能力を有する、組成物に関する。特に、細胞に結合する活性を有する化合物が、該抗体またはその断片と直接結合していることがより好ましい。

本発明において抗体にはモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明の蛋白質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。ポリクローナル抗体は、例えばヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質またはそれらの部分ペプチドを調製し、これを抗原にウサギ、ヤギ、ヒツジなどを免疫してポリクローナル抗体を作製する。抗原ペプチドとしては、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質の細胞外ドメインまたはその断片を用いることができる。抗原ペプチドは、適宜他のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニンやアルブミンなどのキャリア蛋白質に結合させて免疫することができる。モノクローナル抗体は、免疫したマウスやラットの脾細胞を用い、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることにより作製することができる。抗体の作製は、公知の方法に従って行うことができる (Harlow, E. and Lane, D. (eds.), *Antibodies : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Shepherd

, P. and Dean, C. (eds.), *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (Practical Approach Series, 227), Oxford Univ Press, 1999)。ポリクローナル抗体は血清から、モノクローナル抗体ではハイブリドーマ培養上清またはハイブリドーマを接種した動物の腹水から硫酸分画、プロテインGセファロースカラム、抗原を固定したアフィニティークラムなどの一般的な生化学的手法で抗体を精製することができる。本発明において用いられる抗体は、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質のエンベロープ外側の領域（細胞外領域）に結合する抗体を用いることができ、好ましくはモノクローナル抗体、さらに好ましくは実施例12に記載のHN-1 (Miura et al., *Exp. Cell Res.*, 1982, 141, 409-420) である。本発明の抗体は、ヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質（抗原蛋白質）に結合する限り、その抗体断片であってもよい。例えば、Fab、Fab(t)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、抗体可変領域断片 (Fv)、単鎖可変領域断片 (single chain Fv; scFv)、またはそれらの修飾物が含まれる。Fabは抗体H鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖およびL鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖からなる複合体である。これらのポリペプチドは互いに結合し1つの抗原結合部位（1価）を形成する。Fabは、典型的にはイムノグロブリンをパパインで消化することにより得られるが、これと同等の構造を有するものも本発明においてFabと称す。具体的には、FabはイムノグロブリンL鎖と、H鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) および C<sub>H</sub>1を含むポリペプチド鎖とが結合した二量体蛋白質が含まれる。Fab' (イムノグロブリンをペプシン消化後、H鎖間のジスルフィド結合を切断して得られる)、および Fab(t) (イムノグロブリンのトリプシン消化で得られる) など、Fabと同等の構造を有する。またF(ab')<sub>2</sub>とは、抗体の定常領域を欠失する抗体またはそれと同等の形態の蛋白質複合体を言い、具体的には抗体H鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖およびL鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖からなる複合体を2つ有する蛋白質複合体を言う。F(ab')<sub>2</sub>は抗原結合部が2つある二価抗体であり、典型的には抗体をpH 4付近でペプシンにより消化して得られ、H鎖のヒンジ領域を有しているが、他

のプロテアーゼまたは薬剤により切断されたもの、あるいは人工的に設計したものであってよい。scFvとは、抗体H鎖可変領域およびL鎖可変領域が一本のポリペプチド鎖に含まれているポリペプチドを言う。H鎖可変領域およびL鎖可変領域は適当な長さのスペーサーを介して連結されており、互いに結合して抗原結合部を形成する。このような抗体断片は、例えば「日本生化学会編 新生化学実験講座1 2 分子免疫学III 185-195ページ（東京化学同人）」および/または「Current Protocols in Immunology, Volume 1, (John Wiley & Sons, Inc.)」の記載に従って作製することができる。抗体断片は、例えば抗体をペプシン、パパイン、トリプシン等の蛋白質分解酵素で消化することにより得ることができる。あるいは可変領域のアミノ酸配列を解析し、組み換え蛋白質として発現させ調製することが可能である。また抗体には、ヒト型抗体もしくはヒト抗体なども含まれる。抗体は、プロテインAカラムまたはプロテインGカラム等を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

本発明においては、特に抗体の可変領域（抗原結合領域）を含む断片をヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に付加することが好ましい。このような断片としては、抗体のH鎖および/またはL鎖の可変領域を含む所望の断片を用いることができるが、例えば上記のようにFab、Fab(t)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、またはそれらの修飾物を挙げることができる。

本発明において細胞に導入する薬剤は所望の化合物であってよく、例えば天然化合物、合成化合物、無機または有機化合物、低分子または高分子化合物などが挙げられる。また遺伝子は所望の核酸であってよく、DNAまたはRNAなどの核酸およびその誘導体が挙げられる。核酸としては、環状および直鎖状の1本鎖もしくは2本鎖のデオキシリボ核酸であっても、リボ核酸であってもよい。核酸の誘導体としては、例えば、ホスフォロチオエート、ホスフォロジチオエート等が例示される。本発明の組成物で運搬する薬剤または遺伝子としては、具体的には、例えば、アンチセンス核酸（Drug Delivery System, 10, 91-97, 1995）、デコイ（The Jou

Journal of Biological Chemistry, 267, 12403-12406, 1994)、リボザイム (The Drug Delivery System, 10, 91-97, 1995)、三重鎖DNA (細胞工学、13巻、No. 4、277-285、1994)、プラスミドDNA (Methods Enzymology, 221, 317-327, 1993)、RNAベクター、および、これらとキャリアー (Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, 89, 7934-7938, 1992) または、蛋白 (Journal of Biological Chemistry, 266 (6), 3361-3364, 1991) との複合体、あるいは、抗癌剤、抗ウイルス剤、トキシン (ジフテリアトキシン; Biochim Biophys Acta, 1192, 253-262, 1994/リシン; Biochim Biophys Acta, 1070, 246-252, 1991)、酵素 (Immunology, 81, 280-284, 1994)、あるいはその他の所望の生理活性物質を用いることができる。所望の遺伝子をゲノム核酸中に挿入し、組み換えウイルスから該遺伝子を発現させることもできる。

本発明の組成物は、生体への直接投与 (インビボ) および間接投与 (エキスピボ) において使用することができる。また、生体外細胞において投与 (インビトロ) することができる。インビボでの適用においては、投与ルートは薬剤または遺伝子が標的細胞または組織に到達する限り所望の投与経路で投与されてよい。有効成分の性質に応じて、例えば経口的、経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、関節内、または皮下等に行われうるがそれらに限定されない。また、全身的または局所的に投与され得る。インビトロ (エキスピボを含む) での適用においては、本発明の組成物は標的細胞に接触するように添加される。例えば細胞培養液に添加される。本発明の組成物は特に血中での安定性に優れていることから、静脈注射等の血中投与に用いられる注射剤などとして有用である。

本発明の方法により製造されたマイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む複合体は、必要に応じて薬理的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、該複合体と共に投与することが可能であり、

複合体による薬剤または遺伝子の細胞への導入を有意に阻害しない材料である。このような担体または媒体としてな、例えば滅菌水、生理食塩水、培養液、血清、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などと適宜組み合わせて製剤化することが考えられる。マイナス鎖RNAウイルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでよい。また本発明の組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでいてもよい。また、リボソームの膜安定化剤（例えばコレステロール等のステロール類）を含んでいてもよい。また、抗酸化剤（例えばトコフェロールまたはビタミンEなど）を含んでいてもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。また本発明の組成物は溶液、凍結乾燥物、またはエアロゾルの形態の組成物であつてよい。凍結乾燥物の場合は安定化剤としてソルビトール、シュクロース、アミノ酸及び各種蛋白質等を含んでいてもよい。マイナス鎖RNAウイルスベクターを含む組成物は試薬として、および医薬として有用である。

本発明の組成物の投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入する薬剤または遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。マイナス鎖RNAウイルスの感染性ウイルスを含む組成物であれば、投与量は好ましくは約 $10^5$  CIU/mlから約 $10^{11}$  CIU/ml、より好ましくは約 $10^7$  CIU/mlから約 $10^9$  CIU/ml、最も好ましくは約 $1 \times 10^8$  CIU/mlから約 $5 \times 10^8$  CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。ヒトにおいては1回当たりの投与量は $2 \times 10^9$  CIU～ $2 \times 10^{10}$  CIUが好ましく、投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。ヒト以外の動物についても、例えば目的の動物とヒトとの体重比または投与標的部位の容積比（例えば平均値）で上記の投与量を換算した量を投与することができる。



本発明の組成物の投与の対象となる生物としては特に制限はない。例えば、ニワトリ、ウズラ、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ネコ、ウシ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、サル、およびヒトなどを含む鳥類、哺乳動物、およびその他の脊椎動物が挙げられる。本発明の方法をインビトロ（エキスビゴを含む）で用いる場合は、適用個体としては、例えばヒト、非ヒト哺乳動物および鳥類などが挙げられる。本発明の方法をインビボで用いる場合は、適用個体としては特に非ヒト哺乳動物および鳥類などが挙げられる。

また本発明は、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に結合する抗体またはその断片であって、細胞に結合する化合物が結合している抗体またはその断片に関する。このような抗体またはその断片は、マイナス鎖RNAウイルスまたはその処理物に添加することにより該蛋白質に結合し、これによりヘマグルチニン活性を低下させるが、細胞に結合する化合物により細胞への接着を助ける働きが維持される。従って、このような抗体またはその断片は、本発明の薬剤または遺伝子運搬組成物の製造に極めて有用である。抗体またはその断片は、上記のように抗体のL鎖および/またはH鎖の可変領域を含む所望の断片等であってよい。具体的には、例えばFab、Fab(t)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、sc Fvなどが挙げられる。特に、F(ab')<sub>2</sub>は好適に用いられる。細胞に結合する化合物としては、特に細胞表面の受容体のリガンドが好ましく、例えば葉酸トランスフェリン、エリスロポエチン、抗体、レクチン、ガラクトース、マンノースなどを例示することができる。

本発明の抗体またはその断片は、薬学的に許容される担体と共に組成物とすることができる。このような担体としては、例えば水、アルコール、グリセロール、塩、蛋白質、ゼラチン、公知のpH緩衝剤、安定剤、懸濁剤、保存剤などが挙げられる。

また本発明は、(a) マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に結合する抗体またはその断片であって、細胞に結合する化合

物が結合している抗体またはその断片、および (b) 該エンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む薬剤または遺伝子運搬組成物を含むキットに関する。該エンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む薬剤または遺伝子運搬組成物としては、例えば感染性ウイルス粒子、あるいは不活化ウイルスまたは該ウイルスのエンベロープを含むリポソームなどが挙げられる。感染性ウイルス粒子は例えばマイナス鎖RNAウイルスであってもよく、マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を含む他のウイルスであってもよい。これらに上記抗体またはその断片を添加することにより、該エンベロープ蛋白質に抗体またはその断片が結合し、ヘマグルチニン活性が低下した薬剤または遺伝子運搬組成物を調製することができる。例えば生体内投与において血中安定性を高めたい場合など、目的に合わせて適宜ヘマグルチニン活性を制御することが可能となる。これらは使用直前に混和することで容易に調製できるため、非常に使いやすいシステムとなる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、SeVベクターのエンベロープ蛋白（HNおよびF蛋白）へのTPEGおよびSPA-PEG修飾試薬によるPEG修飾を模式的に示す図である。

図2は、SeVベクターおよびTPEG修飾SeVベクターによるラット血液に対する溶血活性を、37℃、15分の条件で測定した結果を示す図である。

図3は、SeVベクターおよびTPEG修飾SeVベクターのラット血液中での安定性を調べた結果を示す図である。37℃で1、15および30分処理した後に、血漿を分離して、HeLa細胞に感染を行い、24時間後のLacZ遺伝子発現を定量した結果である。結果は3例の平均値±標準偏差で表した。

図4は、SeVベクターおよびTPEG修飾SeVベクターをSDS電気泳動を行い、銀染色法により染色した結果を示す写真である。HN蛋白とF蛋白の泳動位置を矢印で示す。0はSeVベクターを、8から10は表2の検体番号8から10に相当する。

図5は、SeVベクターおよびSPA-PEG5K修飾SeVベクターをウサギ抗SeV抗血清存在下（10、100および1000倍希釈血清）でLLCMK2細胞に遺伝子導入後のLacZ発現をX-gal染色法により評価した結果を示す写真である。

図6は、SeVベクターに葉酸結合型抗HNモノクローナル抗体で、HN蛋白への選択的修飾を行う模式図である。

図7は、HN-1、HN-1/F(ab')<sub>2</sub> およびそのNHS法により調製した葉酸結合型抗体で修飾したSeVベクターのHAUを示す図である。横軸は抗体濃度、縦軸は赤血球凝集活性のlog表記（log<sub>2</sub>(HAU)）を表す。

図8は、SeVベクター、HN-1修飾SeVベクターおよび葉酸結合HN-1修飾SeVベクターのニワトリ赤血球に対する溶血活性を調べた結果を示す図である。SeVベクターは $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ および $1 \times 10^9$  pfu/mLで、修飾ベクターはいずれも $1 \times 10^9$  pfu/mLのSeVベクターを100  $\mu$ g/mLの抗体で修飾したベクターでの結果を示す。図の縦軸は、遊離したヘモグロビン量を570nmにおける吸光度で示した。

図9は、SeVベクター、HN-1修飾SeVベクターおよび葉酸結合HN-1修飾SeVベクターをKB細胞に感染を行い、2日後にLacZ遺伝子発現を調べた結果を示す図である。過剰葉酸存在条件とは、感染実験において、培養液中に1mMの葉酸を添加して行った系を示す。結果は3例の平均値±標準誤差で示した。

図10は、HN-1またはHN-1/F(ab')<sub>2</sub>およびその葉酸結合体でSeVベクターを修飾して、KB細胞に感染したときの、感染2日後のLacZ遺伝子発現を調べた結果を示す図である。3例の平均値±標準誤差で示した。

図11は、SeVベクターをHN-1またはEDC法で調製した葉酸結合HN-1で抗体量を変えて修飾したベクターのHAUの変化を示す図である。横軸は抗体濃度、縦軸は赤血球凝集活性のlog表記（log<sub>2</sub>(HAU)）を表す。

図12は、PFG修飾したSeVのタイター変化を示す図である。PEG反応量を変えてSeVを修飾し、修飾SeVベクターの相対感染効率を調べた。

図13は、PFG修飾したSeVのHA活性変化を示す図である。PEG反応量を変えてSe

Vを修飾し、修飾SeVベクターのHA活性を調べた。

図14は、PFG修飾したSeVの感染性とHA活性の相関を示す図である。PEG修飾により、HA活性に対する感染性は上昇し得ることが分かる。

図15は、銀染色によりPFG修飾したSeVの組成蛋白を分析した結果を示す写真である。エンベロープ蛋白であるFとHNに由来するバンドがPEG反応量の増大に伴って減少し、代わりに高分子量画分にバンドが出現した。

図16は、ウェスタンブロッティングによりPFG修飾したSeVの組成蛋白を分析した結果を示す写真である。

図17は、PEG修飾したSeVの中和抗体への抵抗性を示す図および写真である。修飾SeVの総粒子数（総蛋白量）を一定にした条件で比較した。

図18は、PEG10K修飾SeVのin vivo評価を示す図である。修飾SeVの投与スケジュールおよび投与条件、および抗SeV抗体価の変化が示されている。

図19は、PEG10K修飾SeVのin vivo評価を示す写真である。図18に示した修飾SeVのin vivo投与における、肺での導入遺伝子の発現を示す。

図20は、PEG修飾SeVの4℃保存条件での感染性の維持効果を示す図である。

図21は、ポリエチレンイミン（PEI750K）の修飾効果を示す図である。PEIは、PEG修飾SeVの感染性を上昇させた。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、すべて本明細書の一部として組み込まれる。

##### [実施例1] NLS-LacZ遺伝子搭載SeVベクターの調製と精製

核移行シグナル付きLacZ遺伝子（NLS-LacZ）を搭載したNLS-LacZ/SeVは既報の方法により作製した（Kato et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579; Hasan et al., J. Gen. Virol., 1997, 78, 2813-2820）。このベクターを鶏有性卵（10日

卵) に接種して、35.3℃にて3日間培養後、しょう尿液を回収した。4,000rpm、15分の遠心後、上清を10,000rpm、1時間遠心してベクターを沈殿させた。PBSに再懸濁後、蔗糖密度勾配 (30/50%) に重層し、25,000rpm、1時間遠心した (Beckman, ローターSW28)。蔗糖界面のベクターを回収、遠心沈殿後、PBSに再懸濁して精製ベクターのストック (以下SeVベクターと表記) を調製した。ベクターの蛋白濃度は、等容の2% SDS溶液で可溶化したものを検体として用い、BSAを標品として、BCA protein assay (Pierce社) にて測定した。赤血球凝集活性 (HAU) は以下のよう求めた。ベクターを96well丸底プレート (旭テクノグラス) 内でPBSで順次2倍希釈を行った (各50 $\mu$ l)。各wellにPBSで洗浄した1%ニワトリ赤血球液を50 $\mu$ lずつ加え、4℃で1時間静置後に判定を行った。HAUは血球凝集を引き起こすベクターの最大希釈倍数で表した。また、pfu (プラーク・フォーミング・ユニット) の算出は、SeV 1HAU=約10<sup>6</sup>pfuの関係を用いた。精製ベクターは1mg蛋白/ml=4096~5120HAU/ml=約5 $\times$ 10<sup>9</sup>pfu/mlであった。

#### [実施例2] TPEG修飾SeVベクターの調製

実施例1のSeVベクターのストックをPBSで2mg蛋白/mlに希釈した。この溶液0.5mlに0.5Mほう酸緩衝液 (pH8.5) を0.5ml加えて、1mg蛋白/mlのpH8.5溶液を調製した。トレシル活性化PEG試薬 (TPEG、分子量5000: Shearwater Polymers社) 1mgを上記溶液に攪拌しながら少量ずつ加え、室温で90分反応を行った (図1)。反応終了後、反応液を氷冷PBS 14mlで希釈して、15,000rpm、1時間の遠心 (Beckman, ローターSW28.1) によりベクターを回収し、0.8mlのPBSに再懸濁してTPEG修飾SeVベクターを得た。修飾ベクターの蛋白濃度およびHAUは実施例1と同様に求めた。

#### [実施例3] TPEG修飾SeVベクターによるインビトロ遺伝子発現

実施例1のSeVベクターのストックをPBSで希釈して、1 $\times$ 10<sup>5</sup>pfu/mlとした。実施例2のTPEG修飾SeVベクターは未修飾ベクターと蛋白濃度を揃えることでウイルス粒子数を同一にした。実験前日にHeLa細胞 (ヒト子宮頸部癌由来) を12wellプレート (住友ベークライト) に1wellあたり5 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞数 (10%非働化ウシ胎児血

清（以下FCS）添加MEM培地 1ml/well）でシードした。培地を0.5mlに減らし、上記ベクター希釈液を50  $\mu$ l/wellで加え（SeVベクター換算で $5 \times 10^3$  pfu/well、moi = 0.1）、37°C、5% CO<sub>2</sub>で感染を行った。1時間後にベクターを除き、培地で2回洗浄後、新たに2mlの培地を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>で24時間培養した。LacZ遺伝子発現の測定は、Galacto-Light Plus™（Tropix社）のプロトコールに従って行った。細胞蛋白の測定はBCA法（Pierce社）に従った。結果は細胞蛋白あたりのlight unit (RLU/ $\mu$ g protein) で表した。

表1にTPEG-SeVベクターのHAUと遺伝子発現量を示す。同一蛋白濃度、即ち同一ウイルス粒子数で、TPEG-SeVベクターはSeVベクターに比べて2,000分の1以下のHAUであった。一方、同一粒子数でのHeLa細胞における遺伝子発現は約50%維持していた。このように、細胞への遺伝子導入能を極端に損なうことなく、HAUのみを著しく減少したベクターを調製することが可能となった。

表1

	タンパク濃度 (mg/ml)	HAU/mg	LacZ発現量 (RLU/ $\mu$ g cell protein)
SeVベクター	0.93	5120	2335604 $\pm$ 72774
TPEG修飾SeVベクター	0.99	2	1046353 $\pm$ 29841

#### 【実施例4】 溶血活性試験

SD系ラット（オス）をエーテル麻酔下、頸静脈よりヘパリン処理シリンジで採取した新鮮血液を実験に供した。実施例1のSeVベクターおよび実施例2のTPEG修飾SeVベクターをPBSで希釈して、1から1000  $\mu$ g蛋白/mlの溶液を調製した。ベクター希釈液50  $\mu$ lと37°Cに保温したラット血液50  $\mu$ lを混和し、15分間インキュベーションを行った。4°Cで氷冷後、血漿を遠心分離した。血漿中に放出されたヘモグロビン量を570nmにおける吸光度 (OD570) により測定した。なお、ベクター溶液

の代わりにPBSを用いたときを陰性対照、蒸留水を陽性対照（100%溶血）として、以下の計算式よりベクターの溶血活性を算出した。

$$\text{溶血活性 (\%)} = \{ (\text{ベクター溶液のOD570}) - (\text{PBSでのOD570}) \} / \{ (\text{蒸留水のOD570}) - (\text{PBSでのOD570}) \} \times 100$$

図2に示すように、SeVベクターはベクター濃度に依存した強い溶血活性を示した。一方、TPEG修飾SeVベクターの溶血活性は非常に低いことがわかった。TPEG修飾SeVベクター 1000  $\mu$ gの溶血活性はSeVベクター5  $\mu$ gに相当することから、安全性が約200倍向上していると考えられた。

#### 〔実施例5〕 ラット血液中での安定性試験

実施例1のSeVベクターをPBSで希釈して、 $1 \times 10^8$  pfu/mlとした。実施例2のTPEG修飾SeVベクターはウイルス蛋白濃度が同じになるようにPBSで希釈した。ベクター希釈液250  $\mu$ lに、SD系ラット（オス）の新鮮血液250  $\mu$ lを混和して、37°Cでインキュベーションを行った。所定の時間経過後に、血液を80  $\mu$ lサンプリングして、4°Cで遠心分離を行い血漿を回収した。血漿10  $\mu$ lをPBSで50倍に希釈した溶液50  $\mu$ lを用いて、実施例3記載の方法に準じて、HeLa細胞におけるLacZ遺伝子発現を調べた。

図3に示すように、SeVベクターは血液処理直後から著しく不安定化され、15分の処理で血液未処理に比べて1000分の1にまで遺伝子発現能は低下した。一方、TPEG修飾SeVベクターでは、血液中での安定性が改善されており、未修飾ベクターに比べて著しく高い遺伝子発現能を維持していた。

#### 〔実施例6〕 SPA-PEG2K修飾SeVベクターの調製

実施例1のSeVベクターのストック溶液をPBSで希釈して2mg蛋白/mlに調製した。この溶液を0.5Mほう酸緩衝液（pH8.5）で2倍希釈して、1mg蛋白/ml溶液を調製した。分子量2000のスクシニミジル・プロピオン酸誘導体PEG試薬（SPA-PEG2K、Shearwater Polymers社）1、2または4mgを上記溶液に攪拌しながら少量ずつ加え、室温で30分反応を行った（図1）。反応終了後、反応液を氷冷PBS 14mlで希釈を

行い、13,000rpm、1時間の遠心（Beckman、ローターSW28.1）によりベクターを回収し、0.8mlのPBSに再懸濁して、SPA-PEG2K修飾SeVベクターを得た（表2、検体番号1～3）。修飾ベクターの蛋白濃度は実施例1と同様に求めた。

表2

検体名	検体番号	PEG反応量(mg)	HAU/mgタンパク	LacZ遺伝子発現比(%)
SeVベクター (実施例1)		-	4096	100.0 ± 7.5
SPA-PEG2K修飾 (実施例6)	1	1	1024	29.1 ± 2.6
	2	2	512	4.7 ± 0.2
	3	4	<1	0.5 ± 0.01
SPA-PEG5K修飾 (実施例7)	4	1	2048	115.4 ± 14.2
	5	2.5	2048	93.1 ± 4.2
	6	5	512	42.7 ± 4.9
	7	10	<1	1.6 ± 0.1
SPA-PEG20K修飾 (実施例8)	8	10	1024	95.3 ± 9.7
	9	20	4	48.3 ± 1.5
	10	40	<1	0.2 ± 0.02

#### 【実施例7】 SPA-PEG5K修飾SeVベクターの調製

実施例6のSPA-PEG2Kを分子量5000のSPA-PEG5K（Shearwater Polymers社）に変更して、PEG反応量を1、2.5、5または10mgで同様に反応・精製を行い、SPA-PEG5K修飾SeVを得た（表2、検体番号4～7）。

#### 【実施例8】 SPA-PEG20K修飾SeVベクターの調製

実施例6のSPA-PEG2Kを分子量20,000のSPA-PEG20K（Shearwater Polymers社）に変更して、PEG反応量を10、20または40mgで同様に反応・精製を行い、SPA-PEG20K修飾SeVを得た（表2、検体番号8～10）。

図4にSPA-PEG20K修飾ベクターをSDS-電気泳動を行い、銀染色により各構成蛋白を染色した結果を示す。PEG反応量の増大に伴って、HN蛋白に由来するバンドが減少し、代りに高分子量画分にバンドが出現した。これは、PEGが結合したHN蛋白



が高分子化されたものと推測された。一方、F蛋白のバンドの減少は少なかった。このことから、SeVエンベロープへのPEG修飾では、HNとFの2種の蛋白のうちHNへの修飾が主となることがわかった。

#### 〔実施例 9〕 SPA-PEG修飾SeVベクターのHAU活性とインビトロ遺伝子発現

実施例 1 のSeVベクターおよび実施例 6、7 および 8 に記載のPEG修飾SeVベクター（検体番号1から10）について、実施例 1 に記載の方法でHAU活性を測定した。さらに、HeLa細胞におけるLacZ遺伝子発現を、感染moiを0.5、感染後の培養日数を2日間に変更した以外は実施例 3 に記載の方法に従って測定した。

表 2 にHAUとLacZ発現の結果を示す。PEGの反応量の増加に伴い、得られる修飾体のHAUは低下した。LacZ遺伝子発現はSeVベクターに比べると低下するが、PEG反応量を表に示したように制限することにより、発現能の低下を抑えたままHAUを大幅に低下させることができた。このように、修飾条件を選ぶことで、十分な発現能を有する修飾ベクターが得られることがわかった。

#### 〔実施例 10〕 血球存在下でのSPA-PEG修飾SeVベクターによるインビトロ遺伝子発現

実施例 3 と同様に、HeLa細胞を準備した。実験直前に培養液を除き、代りに $1 \times 10^6$ 個/mlに調製したPBS洗浄ニワトリ赤血球を300  $\mu$ l添加した。対照群は赤血球液の代りにPBSを用いた。実施例 1 のSeVベクターまたは表 2 に記載のPEG修飾SeVベクター（検体番号1、2、4、5、6、8および9）を50  $\mu$ l加え、37℃で5分の極短時間での感染を行った。ベクター添加量は表 2 を基に、同じ発現効率となるように調整した。実施例 3 に準じて、細胞を処理し、48時間後におけるLacZ遺伝子発現を測定した。

表 3 に赤血球存在下での各検体の遺伝子発現量を示す。結果は、赤血球非存在下での発現量を100とした相対比で示した。SeVベクターでは赤血球の存在により、遺伝子発現量は約20%にまで低下した。一方、PEG修飾検体はHAU活性の低下に伴って、赤血球とのインタラクションが低減するので、その結果、赤血球存在下

でも高い遺伝子導入を示した。これらの結果は、PEG修飾SeVベクターは、臨床の場において、血液を介しての短時間での遺伝子導入の可能性を示唆するものである。

表 3

検体名	検体番号	赤血球存在下での LacZ遺伝子発現比(%)
SeVベクター (実施例1)		22.5 ± 4.2
SPA-PEG2K修飾 (実施例6)	1	47.6 ± 2.0
	2	49.2 ± 13.8
SPA-PEG5K修飾 (実施例7)	4	34.4 ± 3.4
	5	46.7 ± 4.0
	6	53.9 ± 4.8
SPA-PEG20K修飾 (実施例8)	8	46.1 ± 9.7
	9	49.6 ± 6.1

〔実施例 11〕 中和抗体存在下でのSPA-PEG5K修飾SeVベクターによる遺伝子導入

#### (1) SPA-PEG5K修飾SeVベクターの調製

実施例 1 に準じてNLS-LacZ/SeVベクターを調製・精製を行い、ストックを調製した。このベクターに対して、SPA-PEG5K (5mg) を実施例 7 に記載の方法に準じて反応を行い、SPA-PEG5K修飾SeVベクターを調製した。ベクターのLLCMK2細胞に対するタイターは以下のように求めた。実験前日にLLCMK2細胞を 6 wellプレート (住友ベークライト) に 1 wellあたり  $1 \times 10^6$  細胞数 (10%FCS添加MEM培地 2ml/well) でシードした。ベクターを 1% FCS含有PBSで 1 mg蛋白/ml に希釈して、さらに 10 倍希釈系列を調製した。前記細胞の培地を除去し、希釈ベクター溶液を 1 wellあたり 1 mL を添加して、37℃、5% CO<sub>2</sub> で 1 時間感染を行った。ベクター溶液を除去した後、培地で洗浄、新たな培地を well あたり 2 mL 加えて、さらに 37℃、5% CO<sub>2</sub> で

培養を続けた。2日後に培地を除き、PBSで洗浄した後、LacZ遺伝子を発現している細胞を $\beta$ -Gal staining kit (Invitrogen) によりX-gal染色を行った。x200倍の視野における感染細胞数をwell内の任意の10個所で計数し、その平均値と視野の面積からwell全体でのタイターを次式により求めた。

$$\text{LacZ感染タイター (CIU/mL)} = (\text{感染細胞数}) \times 854.865 \times (\text{希釈倍数})$$

その結果、SeVベクターおよびSPA-PEG5K修飾SeVのタイターはそれぞれ、 $1.4 \times 10^{10}$  CIU/mlおよび $2.7 \times 10^9$  CIU/mlであった。

## (2) 中和抗体存在下での遺伝子導入

実施例 1 1 - (1) 記載のSeVベクターおよびSPA-PEG5K修飾SeVベクターをPBSで希釈して、 $1 \times 10^7$  CIU/mlに調製した。ベクター溶液30  $\mu$ lに、SeVをウサギに免疫して調製した抗SeV抗血清 (56°C、1時間処理) の10、100および1000倍希釈血清またはPBS 30  $\mu$ lを添加して、室温で1時間処理した。実験前日にLLCMK2細胞を12wellプレート (住友ベークライト) に1wellあたり $2 \times 10^5$ 細胞数 (10% FCS添加MEM培地 1ml/well) でシードした。培地を0.5mlに減らし、前記抗血清処理ベクター溶液40  $\mu$ lをウェルに加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>で1時間感染を行った。以下、実施例 1 1 - (1) 同様に2日後のLacZ遺伝子発現をX-gal染色で評価した。

図5に示すように、SeVベクターは抗血清の存在により、遺伝子導入効率が著しく低下した。一方、SPA-PEG5K修飾SeVベクターは抗血清存在下でも十分な遺伝子導入能を維持できた。

## 【実施例 1 2】 抗HNモノクローナル抗体、HN-1の調製および精製

抗HNモノクローナル抗体、HN-1を産生するハイブリドーマ細胞 (Miura et al., Exp. Cell Res., 1982, 141, 409-420) をHybridoma-SFM培地 (Gibco-BRL) で37°C、5% CO<sub>2</sub>で継代培養を続け、 $2 \times 10^5$ 細胞数/mlの細胞浮遊液1000mlを調製した。さらに、2週間培養を続けた後、3,000rpm、10分の遠心分離により得た上清を0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過を行った。モノクローナル抗体の精製はProtein Gカラムクロマトグラフィーにより行った。培養上清を20mMりん酸ナトリウム緩衝液 (pH7

.0) で平衡化した5mlのProtein Gカラム (ファルマシア) にペリスターポンプ (P-1ポンプ: ファルマシア) を用いて流速4.2ml/分で添加して、抗体をカラムに結合させた。20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で洗浄した後、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH2.7) で抗体を溶出した。溶出液を1M トリス-塩酸緩衝液 (pH9.0) で中和後、限外濾過 (セントリプラスー20、分子量カット30,000: アミコン) で濃縮した。PBSで平衡化したPD-10脱塩カラム (ファルマシア) でPBSにバッファー交換した後、再度限外濾過で濃縮して、HN-1のPBS溶液 160  $\mu$ lを得た。蛋白濃度をウシ・ガンマグロブリンを標品として、BCA protein assay (Pierce社) に、より求めた結果、37.6mg/mlであった。

#### [実施例13] 抗HNモノクローナル抗体、HN-1のF(ab')<sub>2</sub> フラグメント化

実施例12の精製モノクローナル抗体HN-1を0.2M 酢酸緩衝液 (pH4.5) で希釈して2mg蛋白/mlに調製した。蛋白溶液2.35mlに0.1mg/mlに調製したペプシン (Sigma社) の0.2M酢酸緩衝液 (pH4.5) を2.35ml添加して、37°Cで21時間反応を行った。1N 水酸化ナトリウム 700  $\mu$ lで中和した後、PBSを加えて全量25mlとした。この溶液をPBSで平衡化した1mlのProtein Aカラム (ファルマシア) に負荷し、未反応の抗体を吸着させた。カラムを素通りした画分を回収し、実施例12に準じて限外濾過により濃縮した。濃縮液をさらに、PBSで平衡化したセファデックス75カラム (ファルマシア) を用いたゲル濾過法により精製した。限外濾過により濃縮し、HN-1のF(ab')<sub>2</sub> フラグメント (以下HN-1/F(ab')<sub>2</sub>) のPBS溶液を300  $\mu$ l回収した。実施例12同様に蛋白濃度測定を行った結果、4.08mg/mlのHN-1/F(ab')<sub>2</sub> を得た。

#### [実施例14] NHS法による葉酸結合モノクローナル抗体の調製

##### (1) NHS活性化葉酸の合成

合成はRobertらの方法 (Journal of Biological Chemistry: Feb. 4, 269 (5), 3198-3204, 1994) に準じて行った。即ち、葉酸 (Sigma社) をジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解して、50mg/mlの溶液を調製した。250  $\mu$ lのトリエチルアミ

ン (Pierce社)、470mgのジシクロヘキシルカルボジイミド (東京化成)、および260mgのN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS、Sigma社) を順に加え、室温、暗所で一晩攪拌した。析出した副反応物を濾過により除去し、濾過液を250mlのジエチルエーテルに攪拌しながら滴下した。析出した黄色沈殿をエーテル洗浄を繰り返し、減圧乾燥して、NHS活性化葉酸を得た。

## (2) 葉酸結合HN-1の調製

実施例12の方法に準じて精製したHN-1の2.0mg蛋白/ml PBS溶液 100  $\mu$ lと0.5M ほう酸緩衝液 (pH8.5) 100  $\mu$ lを混和したものを反応溶液とした。実施例14-

(1) 記載のNHS活性化葉酸のDMSO溶液 (5mgまたは10mg/ml) 2.5  $\mu$ lを滴下して、室温、暗所1時間反応を行った。室温、暗所で1時間反応を行った後に、PBSで平衡化したPD-10カラムで未反応の葉酸を除去し、蛋白画分を回収した。限外濾過法で濃縮して、葉酸結合HN-1を得た。蛋白濃度は実施例12に準じて測定した。

## (3) 葉酸結合HN-1/F(ab')<sub>2</sub>の調製

実施例14-(2)のHN-1をHN-1/F(ab')<sub>2</sub>溶液に、NHS活性化葉酸の濃度を10mg/mlに変更して、同様に反応、精製を行い葉酸結合HN-1/F(ab')<sub>2</sub>を得た。

## [実施例15] 葉酸結合モノクローナル抗体修飾SeVベクターのHA活性

実施例1記載のNLS-LacZ/SeVをPBSで $1 \times 10^8$  pfu/mlに希釈し、96ウェル丸底プレートに50  $\mu$ lずつ分注した。実施例12の方法に準じて精製したHN-1、実施例13のHN-1/F(ab')<sub>2</sub>、および実施例14に記載した葉酸結合HN-1ならびに葉酸結合HN-1/F(ab')<sub>2</sub>をPBSで希釈して1から100  $\mu$ g蛋白/mlに調製した。抗体希釈液50  $\mu$ lをベクターと混和して、室温で30分静置して、修飾ベクターを調製した (図6)。その後、実施例1の方法に従って、HAUを測定した。

図7にHAUの測定結果を示す。いずれの修飾体も抗体添加量の増加に伴って、HAUが低下し、10  $\mu$ g/ml以上の抗体濃度では検出限界以下となった。また、葉酸の結合によるHAUの阻害活性の極端な低下は認められなかった。これらのことから、赤血球とのインタラクションを著しく低減させた、葉酸結合抗体修飾SeVベクターの

調製が可能となった。

〔実施例16〕 葉酸結合モノクローナル抗体修飾SeVベクターの溶血活性

実施例1記載のNLS-LacZ/SeVをPBSで $1 \times 10^9$  pfu/mlに希釈し、96ウェル丸底プレートに $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。実施例12の方法に準じて精製したHN-1、および実施例14に記載した葉酸結合HN-1をPBSで $100 \mu\text{g}$  蛋白/mlに希釈した。抗体希釈液またはPBS  $50 \mu\text{l}$ をベクターと混和して、室温で30分静置して、修飾ベクターを調製した。溶血活性は、実施例4記載の方法のラット血液を $1 \times 10^9$  細胞数/mLのニワトリ赤血球PBS溶液に、インキュベート時間を30分に変更した以外は同様にを行い、溶血活性を調べた。

図8に溶血活性の測定結果を示す。HN-1および葉酸結合HN-1で修飾したSeVベクターの溶血活性は非常に小さかった。SeVベクターの溶血活性と比較すると、 $1/10$ 濃度のSeVベクターよりも低い溶血活性であった。

〔実施例17〕 葉酸結合モノクローナル抗体修飾SeVベクターのインビトロ遺伝子導入試験

実施例15の、SeVベクターを $1 \times 10^7$  pfu/mlに、抗体濃度を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ に変更して修飾ベクターを調製した。実験前日にKB細胞（ヒト鼻咽腔ガン由来）を12wellプレートに1wellあたり $2 \times 10^5$  細胞数（10%FCS添加、葉酸不含RPMI1640培地：Gibco-BRL、 $1\text{ml}/\text{well}$ ）でシードした。実験1時間前に培地を $0.5\text{ml}$ の葉酸不含RPMI1640培地または同培地に $1\text{mM}$ の葉酸を添加した培地に交換して使用した。上記ベクター除液を $20 \mu\text{l}/\text{well}$ で加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ で感染を行った。3時間後にベクターを除き、培地で2回洗浄後、新たにウェルあたり $2\text{ml}$ の培地を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ で48時間培養した。LacZ遺伝子発現の測定は実施例3に準じて行った。

図9にKB細胞におけるLacZ遺伝子発現の結果を示す。HN-1修飾SeVベクターの遺伝子発現は、未修飾のSeVベクターの100分の1以下となり、HAUの消失に伴う遺伝子導入の低下を認めた。一方、葉酸結合HN-1については、葉酸非結合に比べ有意な遺伝子発現の増加を認め、未修飾SeVベクターの約15%の遺伝子導入を示した。

過剰の葉酸が培地中に存在したときに、葉酸結合HN-1において遺伝子導入に阻害が認められたことから、葉酸結合HN-1による遺伝子導入は、リガンドとして結合した葉酸がKB細胞の葉酸レセプターに結合し、その後F蛋白による融合により起こったと推測された。

図10に抗体分子がHN-1/F(ab')<sub>2</sub>のときの比較を行った。HN-1同様にHN-1/F(ab')<sub>2</sub>においても、葉酸結合のときにのみ高い遺伝子導入を示した。

#### [実施例18] EDC法による葉酸結合HN-1の調製と修飾体の評価

##### (1) EDC法による葉酸結合HN-1の調製

Leamonらの報告の方法に従って調製した (Journal of Biological Chemistry, 1992, 267, (35), 24966-24971)。即ち、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した、10mg/mlの葉酸 (Sigma社) 溶液1mlに21.7mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC: Sigma社) のDMSO溶液1mlを加え、室温、暗所で30分静置した。PBSで1mg蛋白/mlに調製した実施例12のHN-1溶液300 $\mu$ lに前記の葉酸-EDC溶液16.6 $\mu$ lを攪拌しながら滴下した。室温、暗所で1時間反応を行った後に、実施例14-(2)と同様にして葉酸結合HN-1を得た。

##### (2) 葉酸結合HN-1修飾SeVベクターのHA活性

実施例15の葉酸結合HN-1を実施例18-(1)記載のものに変更して修飾ベクターを調製し、HAUを測定した。

図11に示すように、EDC法で調製した葉酸結合HN-1についても同様に、SeVベクターを修飾することでそのHAUを消失させる効果があった。

##### (3) 葉酸結合HN-1修飾SeVベクターによる遺伝子発現

実施例1のSeVベクターの $1 \times 10^7$ pfu/ml溶液と、実施例12のHN-1ならびに実施例18-(1)記載の葉酸結合HN-1の100 $\mu$ g/ml溶液を用いて修飾ベクターを調製した。実施例16のKB細胞に加えて、A549細胞 (ヒト肺カルシノーマ) を使用して、同様に感染実験を行った。

表4に葉酸レセプターを高発現しているKB細胞と、レセプターがほとんどないA

549細胞 (Wang et al., Bioconjugate Chemistry. 1997, 8, 673-679) の遺伝子発現の比較を行った。葉酸結合HN-1修飾SeVベクターはKB細胞の、過剰葉酸非存在下でのみ高い遺伝子導入を示したことから、HN蛋白のヘマグルチニン活性に置き換えた葉酸リガンドが葉酸レセプターへの結合を担うことにより特異的に遺伝子導入をすることがわかった。

表 4

LacZ遺伝子発現相対比 (SeVベクター、過剰葉酸 (-) を100%とする)

	過剰葉酸	K B 細胞	A 5 4 9 細胞
SeVベクター	-	100.0±10.9	100.0±6.6
	+	107.7±12.3	142.1±13.3
HN-1修飾 SeVベクター	-	0.5±0.1	0.8±0.1
葉酸結合HN-1修飾 SeVベクター	-	14.8±1.3	3.2±0.7
	+	2.4±0.1	2.4±0.6

#### [実施例 19] GFP搭載SeVベクターの調製と精製

GFP遺伝子を搭載したSeV/GFPは既報の方法により作製した (Kato et al., Gene s Cells, 1996, 1, 569-579; Hasan et al., J. Gen. Virol., 1997, 78, 2813-2820)。このベクターを鶏有精卵 (10日卵) に接種して、35.3℃にて3日間培養後、しょう尿液を回収した。4℃, 3000 rpm, 30 minの遠心後、上清を4℃, 35000g, 1 h遠心してベクターを沈殿させた。PBSに再懸濁後、再度4℃, 3000 rpm, 30 minの遠心をし、上清を4℃, 35000g, 1 h遠心してベクターを沈殿させた。PBSに再懸濁して精製ベクターのストック (以下SeVベクターと表記) を調製した。ベクターの蛋白濃度は、等容の3% Triton X-100溶液で可溶化したものを検体として用い、BSAを標品として、BCA Protein assay (Pierce社) にて測定した。精製ベクターは約1 mg蛋白/mlであった。



#### 〔実施例 20〕 SPA-PEG2K修飾SeVベクターの調製

実施例 19 のSeVベクターのストック0.5 mlに0.5 mlホウ酸緩衝液 (pH8.5) を加え、0.5 mg蛋白/mlのpH8.5溶液を調製した。分子量2000のスクシニミジル・プロピオン酸誘導体PEG試薬 (SPA-PEG2K、Shearwater Polymers社) を0、2、4、6、8、10 mgを上記溶液に攪拌しながら少量ずつ加え、室温で1時間反応を行った。反応終了後、反応液を4℃、15000 rpm、1 h遠心後、沈殿を氷冷PBSに懸濁し、再度4℃、15000 rpm、1 h遠心によりベクターを回収し、0.5 mlのPBSに再懸濁して、SPA-PEG2K修飾SeVベクターを得た。修飾ベクターの蛋白濃度は実施例 19 と同様に求めた。

#### 〔実施例 21〕 SPA-PEG5K修飾SeVベクターの調製

実施例 20 のSPA-PEG2Kを分子量5000のSPA-PEG5K (Shearwater Polymers社) に変更してPEG反応量を0、5、10、15、20、25 mgで同様に反応・精製を行い、SPA-PEG5K修飾SeVを得た。修飾ベクターの蛋白濃度は実施例 19 と同様に求めた。

#### 〔実施例 22〕 PEG2NHS-10K修飾SeVベクターの調製

実施例 20 のSPA-PEG2Kを分子量10000のPEG2NHS-10K (2本鎖、Shearwater Polymers社) に変更してPEG反応量を0、10、20、30、40、50 mgで同様に反応・精製を行い、PEG2NHS-10K修飾SeVを得た。修飾ベクターの蛋白濃度は実施例 19 と同様に求めた。

#### 〔実施例 23〕 PEG修飾SeVベクターの赤血球凝集活性 (HAU) とin vitro感染性 (CIU)

実施例 20、21、22に記載したPEG修飾SeVベクターについて赤血球凝集活性 (HAU) 及びin vitro感染性 (CIU) を調べた。図12、13および14に示したように、上記3種類PEG修飾SeVベクターのHAU及びCIUを測定したところ、どれもPEG 反応量の増加によってHAUとCIUが低下する傾向が見られた。分子量が大きいほど、反応量の増加によるHAUとCIUの低減幅が小さい。また、HAUとCIUの相関を考察したところ、適量のSPA-PEG5K修飾した場合、未修飾と比べて1 HAUあたり

のCIUが約7-8倍高かった。これはPEG修飾によって感染性を維持しつつ、赤血球凝集を低減し、血中安定性を向上できる可能性を示すと考えられる。

HAUは以下のように求めた。ベクターを96 well丸底プレート（旭テクノグラス社）内でPBSで順次2倍希釈を行った（50  $\mu$ l）。各wellにPBSで洗浄した1%ニワトリ赤血球液を50  $\mu$ lずつ加え、4℃で1時間静置後に判定を行った。HAUは赤血球凝集を引き起こすベクターの最大希釈倍数で表した。

CIUは以下のように求めた。ベクターをPBS/1%BSAで順次10倍希釈を行い、24-wellでコンフルエントになったLLC-MK2細胞へ10  $\mu$ l/well感染させ、2日後、wellあたりのGFP発現細胞数を数えて算出した。

#### 〔実施例24〕 PEG修飾の確認

実施例20、21、22に記載したPEG修飾SeVベクターを0.5  $\mu$ g/laneを用いてSDS-PAGEを行った。図15に示したように、ゲルを銀染色してウイルスベクターの組成蛋白を分析したところ、エンベロープ蛋白であるFとHNに由来するバンドがPEG反応量の増大に伴って減少し、代わりに高分子量画分にバンドが出現した。HN蛋白と比べてF蛋白量の減少が少なかったことから、比較的HN蛋白がF蛋白より多く修飾されたことが考えられる。また、図16に示したように、ウェスタンブロッティングでウサギ由来の抗F1ポリクローナル抗体とマウス由来抗HNモノクローナル抗体を用いてPEG修飾SeVベクターのエンベロープ蛋白であるFとHN蛋白を分析したところ、銀染色と同じような結果が得られた。

#### 〔実施例25〕 中和抗体存在下でのPEG2-NHS10K修飾SeVベクターによるin vitroでの遺伝子導入

実施例22に準じてPEG反応量を0、15、20、25mgで同様に反応・精製を行い、PEG2-NHS10K修飾SeVを得た。修飾ベクターの蛋白濃度は実施例19と同様に求めた。ベクター溶液をPBS/1%BSAで希釈し、0.01  $\mu$ g/ $\mu$ lに調製した。ベクター溶液35  $\mu$ lに、SeVをウサギに免疫して調製した抗SeV抗血清（56℃、1時間処理）の10、100及び1000倍希釈血清またはPBS/1%BSA 35  $\mu$ lを添加して、室温で1時間処理し

た。24-wellにコンフルエントになったLLC-MK2細胞へ上記抗血清処理ベクター溶液をwellあたり 20  $\mu$ l 加え、感染を行った。感染後3日目のGFP発現は蛍光顕微鏡で写真を撮影し、また蛍光プレートリーダーを用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nmで測定したGFP蛍光強度で定量的に評価した。

図17に示したように、未修飾のSeVベクターは抗体濃度の増加によって感染効率が低下する傾向が見られたが、PEG2-NHS10Kの修飾によって、その低下が押さえられ、どの抗体濃度でも未修飾と比べて感染効率が高く、最大約70%の感染効率の改善が見られた。

#### [実施例26] PEG2-NHS10K修飾SeVベクターによるin vivoでの遺伝子導入

実施例25にPEG反応量を0 mgで調製した未修飾SeVコントロールと20 mgで調製したPEG修飾SeVを用いてマウスへの繰り返し投与を行った。図18および19に示したように、実験群は5グループに分け、1回目でLuciferase搭載SeVを点鼻投与して抗SeV抗体を作らせ、2週間後にグループBではGFP搭載の未修飾SeVコントロール、グループCでは、PEG修飾SeVを用いて2回目投与を行った。グループAは未処置コントロール、DとEは1回のみ投与のコントロールとした。1回目投与前、投与後1週間、2週間の時点でマウスから採血し、市販のELISAキット（プレザイム「生研」デンカ生研株式会社）を用いて抗SeV抗体価を測定した。1回目投与をしたグループB、Cのマウスでは抗SeV抗体価の上昇が見られた。この抗体価が十分上がった2週間目に2回目の投与を行い、2日後マウスを解剖し、肺でのGFP発現を蛍光顕微鏡で観察し、写真を撮影した。

図19の蛍光写真で示したように、1回目の投与では、広い範囲にわたってSeVの感染が見られ、未修飾とPEG修飾したベクターの間に大きな差は見られなかった。2回目の投与では、未修飾の場合、GFP発現が全体像からほとんど見えず、拡大しても肺表面の一部にまばらにしか観察できなかった。一方、PEG修飾した場合、1回目と比べれば少なかったが、GFP発現細胞は未修飾と比べて多く、より広い範囲に観察された。特に拡大した写真に見られるようなGFP発現細胞のコロニーが観

察された。

〔実施例 27〕 PEG修飾によるSeVの4℃保存条件での感染性維持効果

実施例 20 のSPA-PEG2Kを分子量20000のPEG2NHS-20K（2本鎖、Shearwater Polymers社）に変更してPEG反応量を10、20、40 mgで、分子量40000のPEG2NHS-40K（2本鎖、Shearwater Polymers社）に変更してPEG反応量を20、40、80 mgで、同様に反応・精製を行い、PEG2NHS-20K修飾SeVとPEG2NHS-40K修飾SeVを得た。修飾ベクターの蛋白濃度は実施例 19 と同様に求めた。

実施例 5 で用いた方法で、4℃で8日と20日保存した上記PEG修飾SeVと未処置SeVのCIUを測定した。図 20 に示したように、未処置SeVコントロールは4℃で2週間保存した後、タイターが3分の1に低下したが、適量の高分子量の2本鎖PEGで修飾したものは最大80%近い感染効率を維持した。

〔実施例 28〕 PEI修飾によるPEG修飾SeVの感染効率の改善

実施例 21 にPEG反応量を0、5、10、15 mgで調製したものを分子量750000のpolyethylenimine（PEI, SIGMA社）を用いてPEI:SeV重量比 0、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2で修飾し、LLC-MK2細胞への感染効率を測定した（測定方法は実施例 23 を参照）。図 21 に示したように、一定量のPEI添加では、PEG修飾したSeVの感染効率を約10倍増加する効果があった。PEG修飾量が多いほどPEIの感染効率の改善効果があった。分子量25000のPEI（SIGMA社）でも同様な結果が得られた。

産業上の利用の可能性

薬物治療または遺伝子治療において薬物（特に高分子化合物）や核酸等の生理活性物質を、目的とする細胞または細胞内組織に到達させるシステム、すなわちドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System；以下単にDDSと言う）は重要な技術分野である。DDSはウイルスベクターを用いて、あるいは人工的なまたは半人工的な輸送担体（キャリアー）に、所望の生理活性物質を封入または担持させた組成物を投与することにより実施することができるが、本発明によりこの両

方においてヘマグルチニン活性を低下させ、血中での安定性および遺伝子導入効率を向上させることが可能となった。例えばウイルスベクターを用いたDDSでは、マイナス鎖RNAウイルスベクターあるいは該ウイルスのヘマグルチニン活性を持つエンベロープ遺伝子でシュード化したウイルスベクターなどに本発明を適用すれば、ヘマグルチニン活性を特異的に低下させたウイルスベクターを製造することができる。また人工的にリボソーム等を調製する場合においても、本発明を適用することによりヘマグルチニン活性を低下させることができる。本発明を用いて製造されるDDSのための組成物は、生体内への適用に極めて優れた効果を発揮する。

## 請求の範囲

1. マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質を有する細胞膜を含む、薬剤または遺伝子運搬組成物であって、(a) 該蛋白質に化合物が付加されており、(b) 該化合物が付加されていない場合に比べヘマグルチニン活性が低下しており、(c) 該薬剤または遺伝子を標的とする細胞へ導入する能力を有する、組成物。
2. さらに(d) 該化合物が付加されていない場合に比べ赤血球に対する溶血活性が低下している、請求項1に記載の組成物。
3. 該組成物が、該マイナス鎖RNAウイルスの感染性ウイルス粒子を含む組成物である、請求項1または2に記載の組成物。
4. 該組成物が、該マイナス鎖RNAウイルスの不活化ウイルスまたは該ウイルスのエンベロープの部分を含む、請求項1または2に記載の組成物。
5. 該マイナス鎖RNAウイルスが、パラミクソウイルス科ウイルスである、請求項1から4のいずれかに記載の組成物。
6. 該パラミクソウイルス科ウイルスが、センダイウイルスである、請求項5に記載の組成物。
7. 該蛋白質に付加されている化合物が分子量1,800以上である、請求項1から6のいずれかに記載の組成物。
8. 該蛋白質に付加されている化合物が分子量4,500以上である、請求項7に記載の組成物。
9. 該蛋白質に付加されている化合物が分子量16,000以上である、請求項8に記載の組成物。
10. 該蛋白質に付加されている化合物がポリエチレングリコールである、請求項1から9のいずれかに記載の組成物。
11. 該蛋白質が、さらにポリエチレンイミンと共に複合体を形成している、請

求項1から10のいずれかに記載の組成物。

12. 該蛋白質が、細胞に結合する化合物と共に複合体を形成している、請求項1から11のいずれかに記載の組成物。

13. 該細胞に結合する化合物が、該蛋白質に付加されている化合物と結合している、請求項12に記載の組成物。

14. 該蛋白質に付加されている化合物が、該蛋白質に結合する抗体またはその断片である、請求項12または13に記載の組成物。

15. 該細胞に結合する化合物が、細胞表面の受容体のリガンドである、請求項12から14のいずれかに記載の組成物。

16. 該リガンドが葉酸である、請求項15に記載の組成物。

17. マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に結合する抗体またはその断片であって、細胞に結合する化合物が結合している抗体またはその断片。

18. 抗体またはその断片がF(ab')<sub>2</sub>である、請求項17に記載の抗体またはその断片。

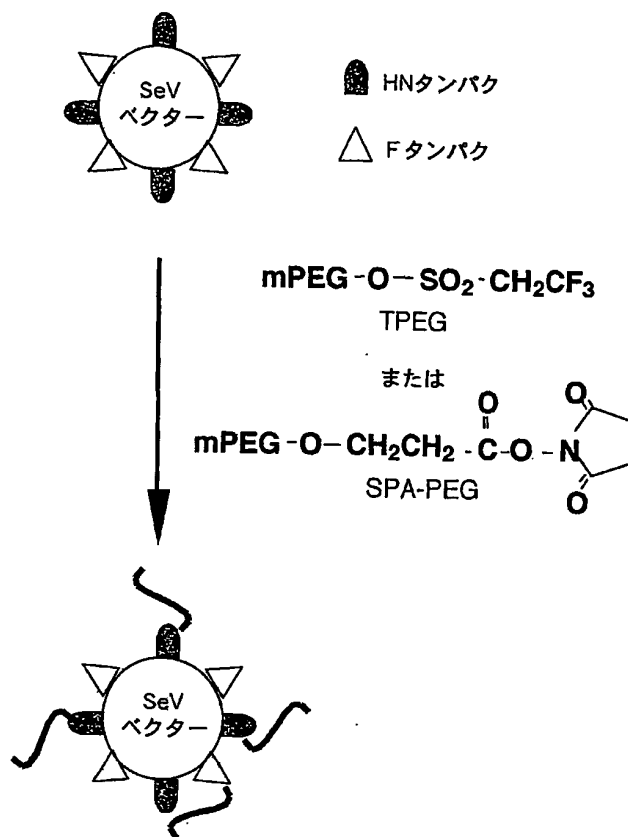
19. 細胞に結合する化合物が細胞表面の受容体のリガンドである、請求項17または18に記載の抗体またはその断片。

20. 該リガンドが葉酸である、請求項19に記載の抗体またはその断片。

21. (a) マイナス鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に結合する抗体またはその断片であって、細胞に結合する化合物が結合している抗体またはその断片、および (b) 該エンベロープ蛋白質を含む薬剤または遺伝子運搬組成物、を含む薬剤または遺伝子運搬キット。

1 / 2 1

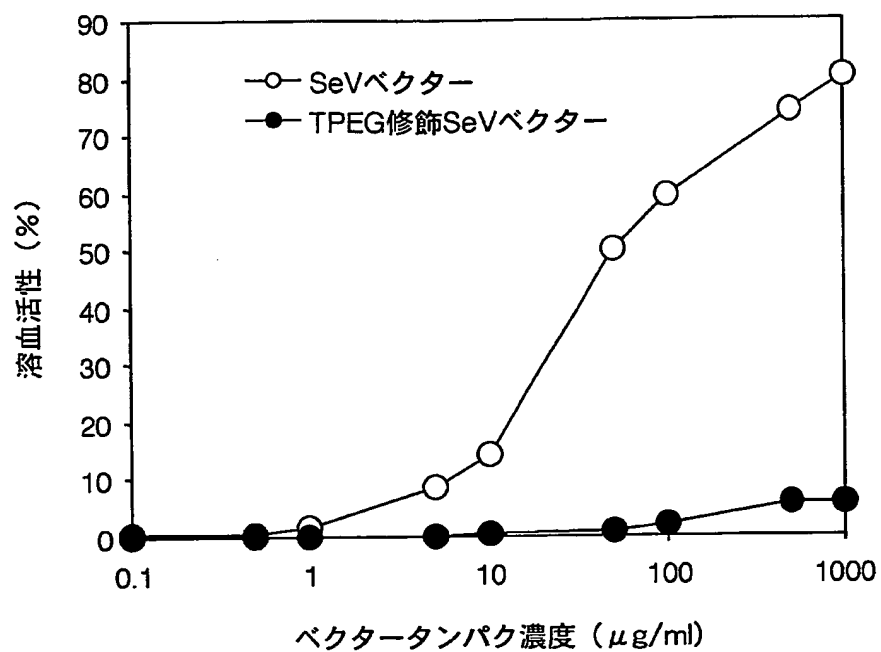
図 1





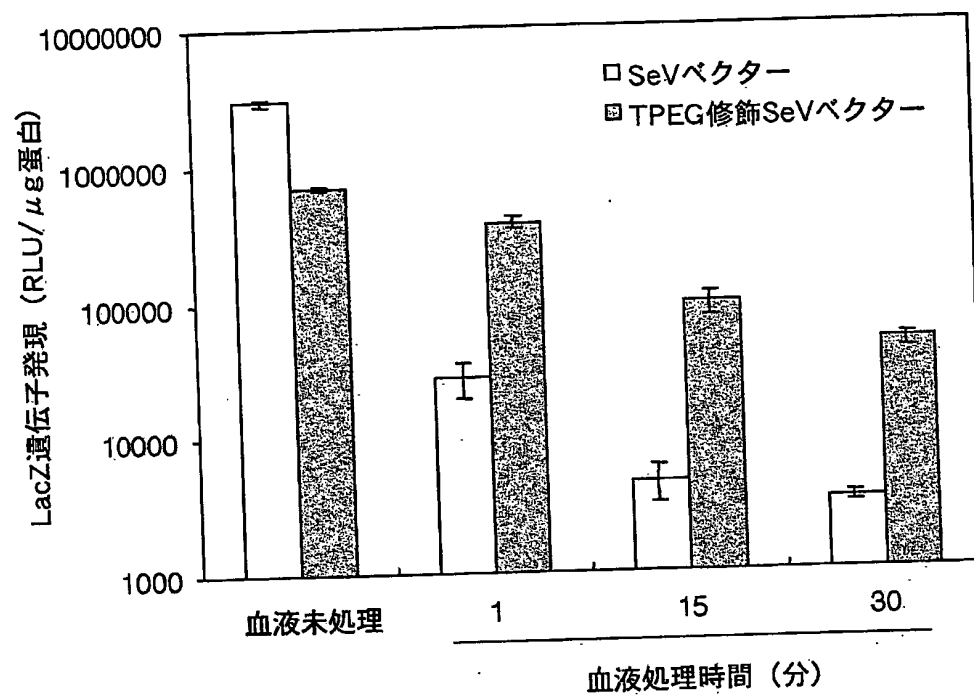
2 / 2 1

図 2



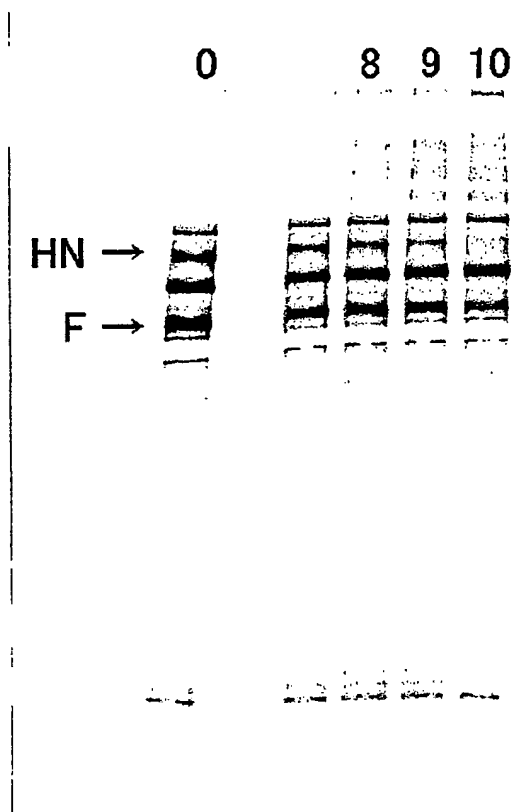
3 / 2 1

図 3



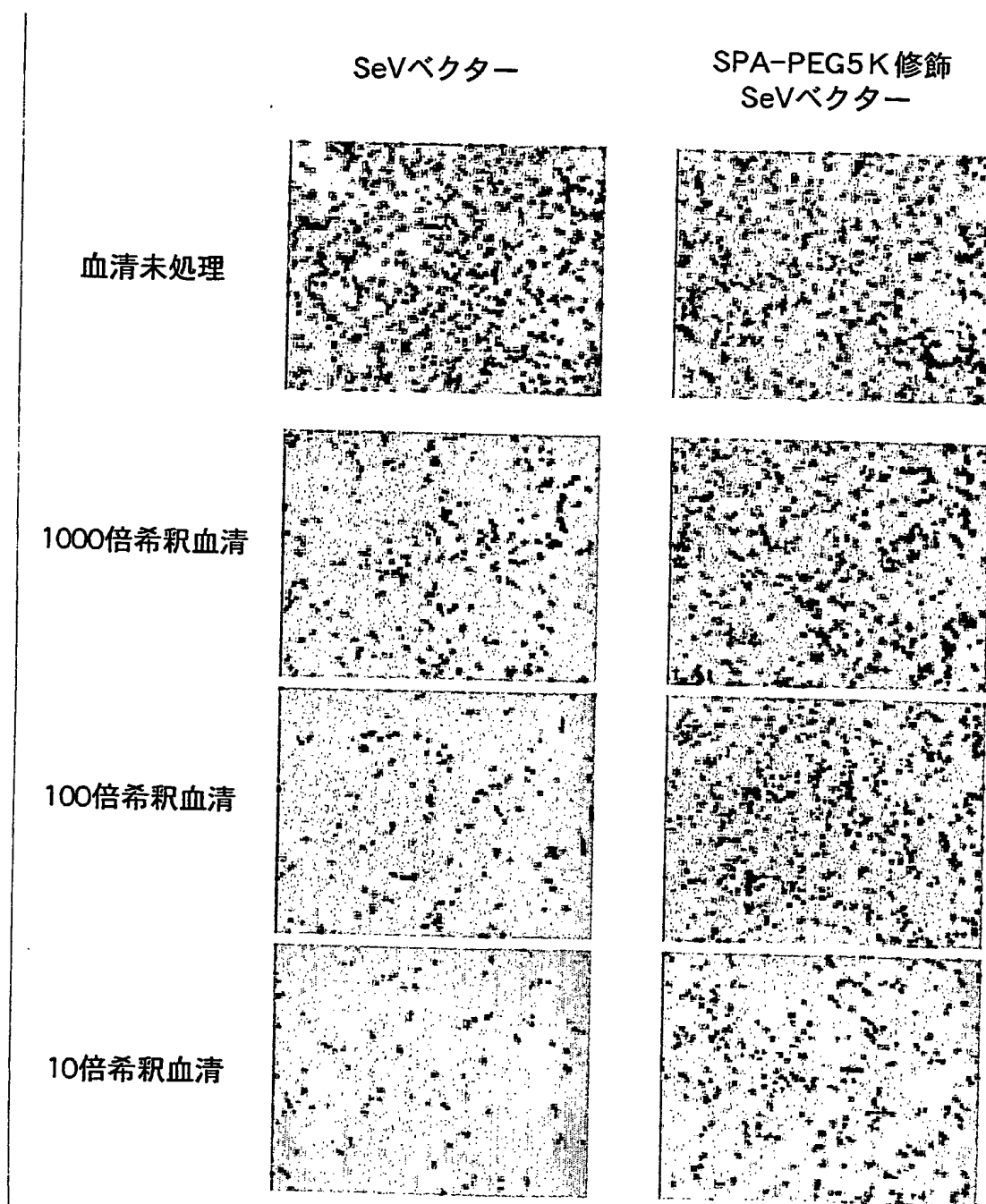
4/21

図 4



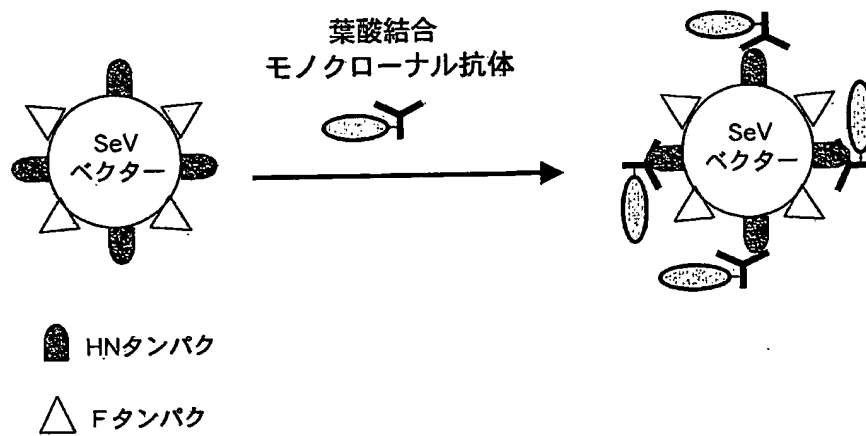
5 / 21

図5



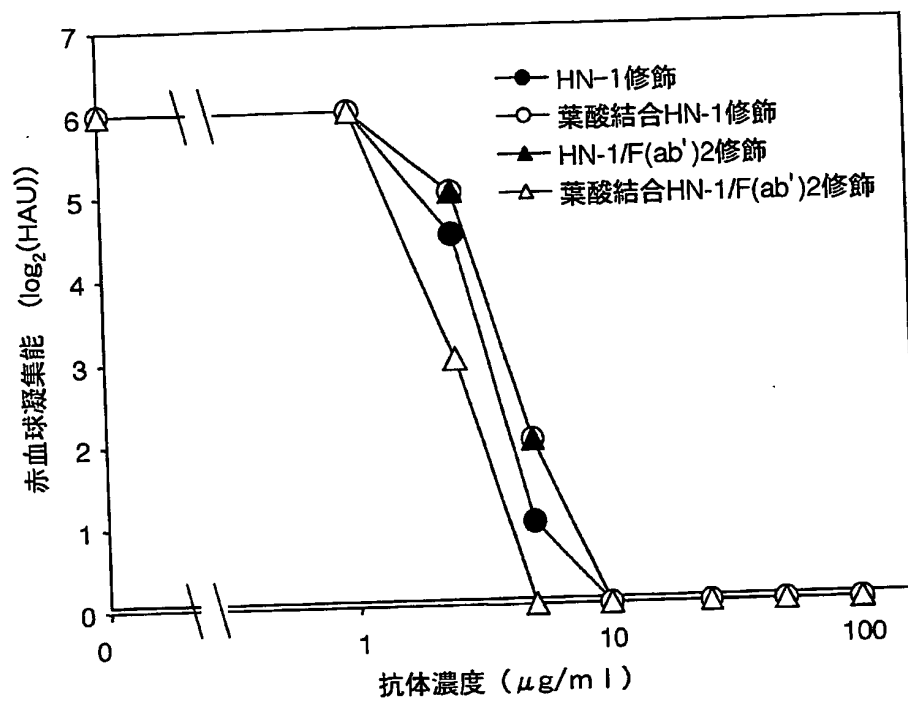
6 / 21

図 6



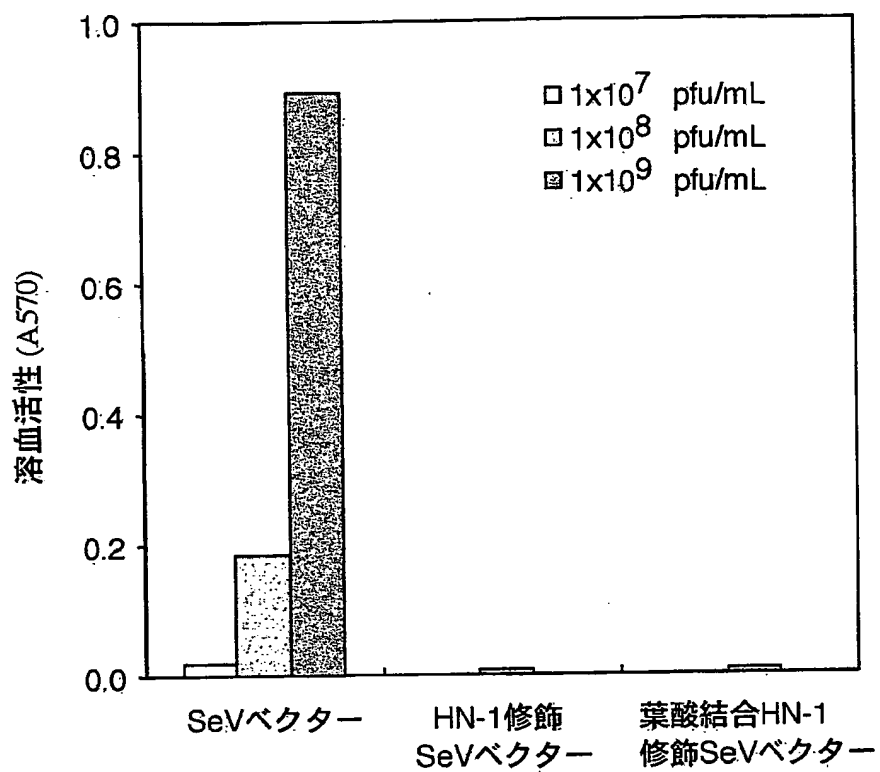
7 / 21

図 7



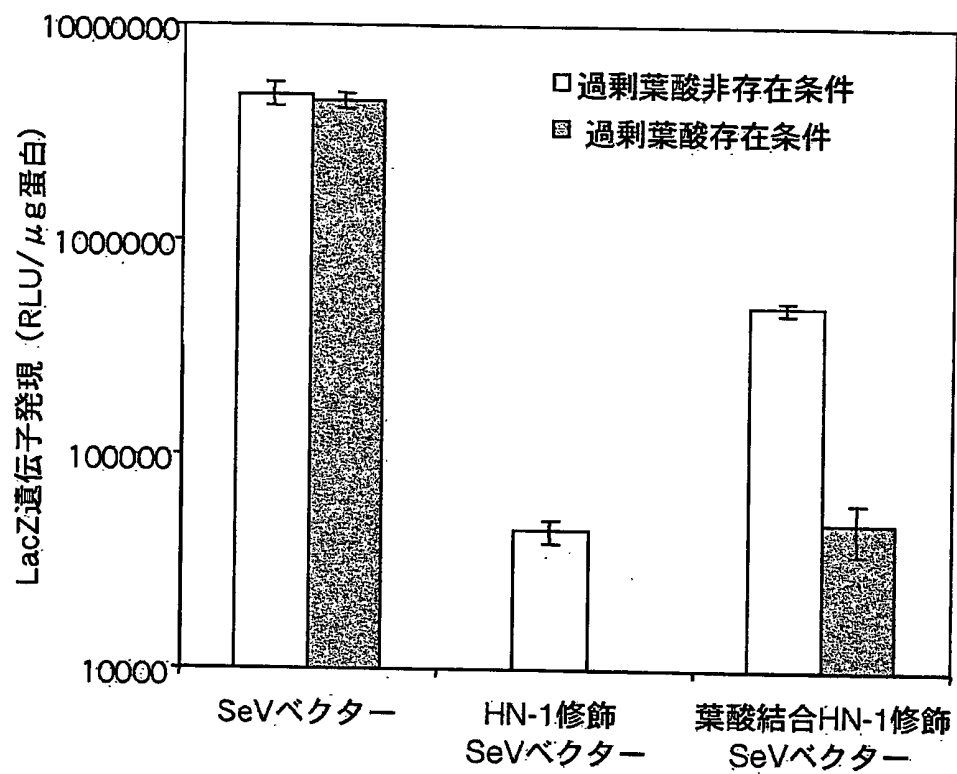
8 / 21

図 8



9 / 21

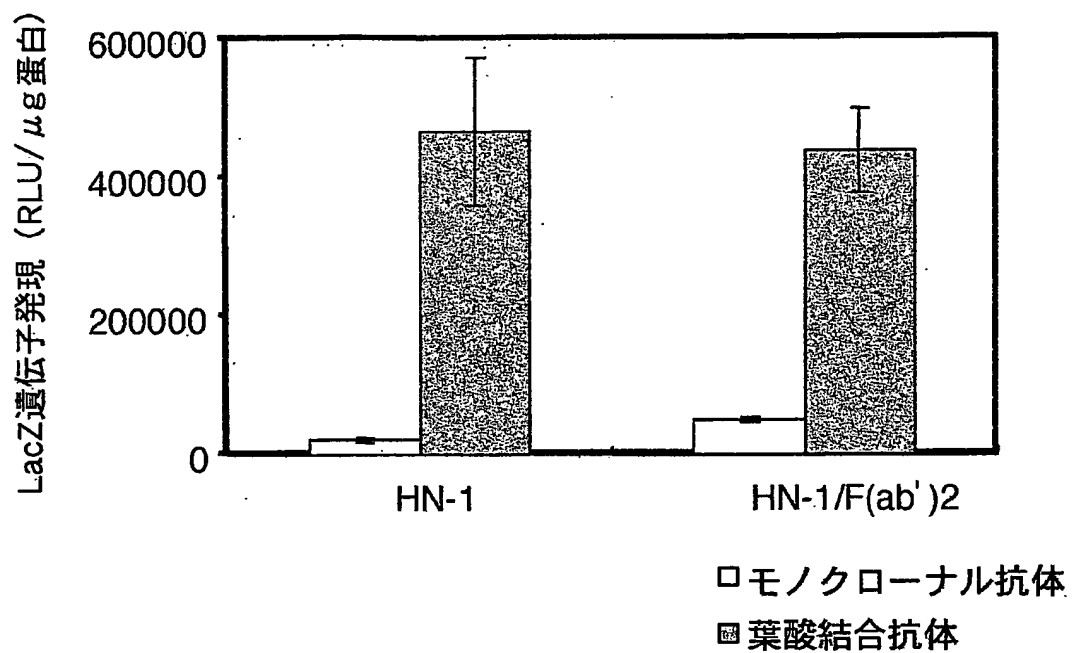
図9





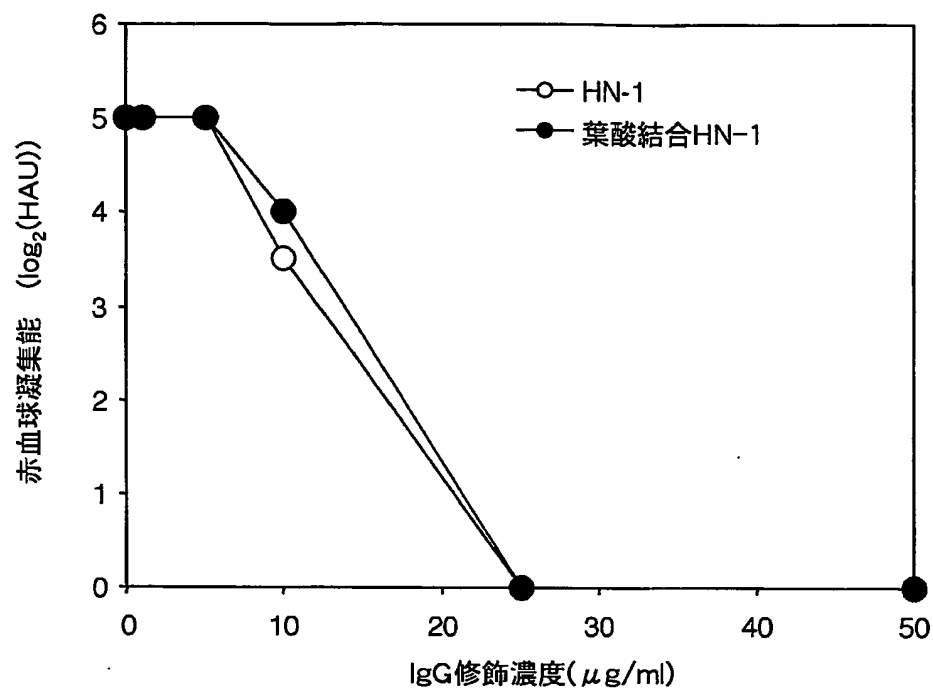
10/21

図10



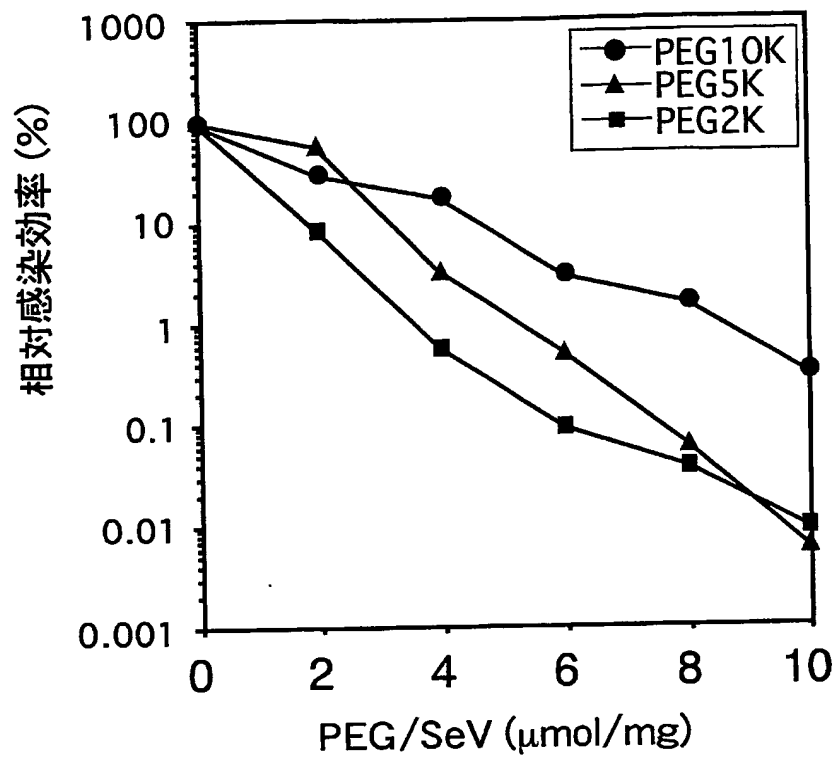
11 / 21

図11



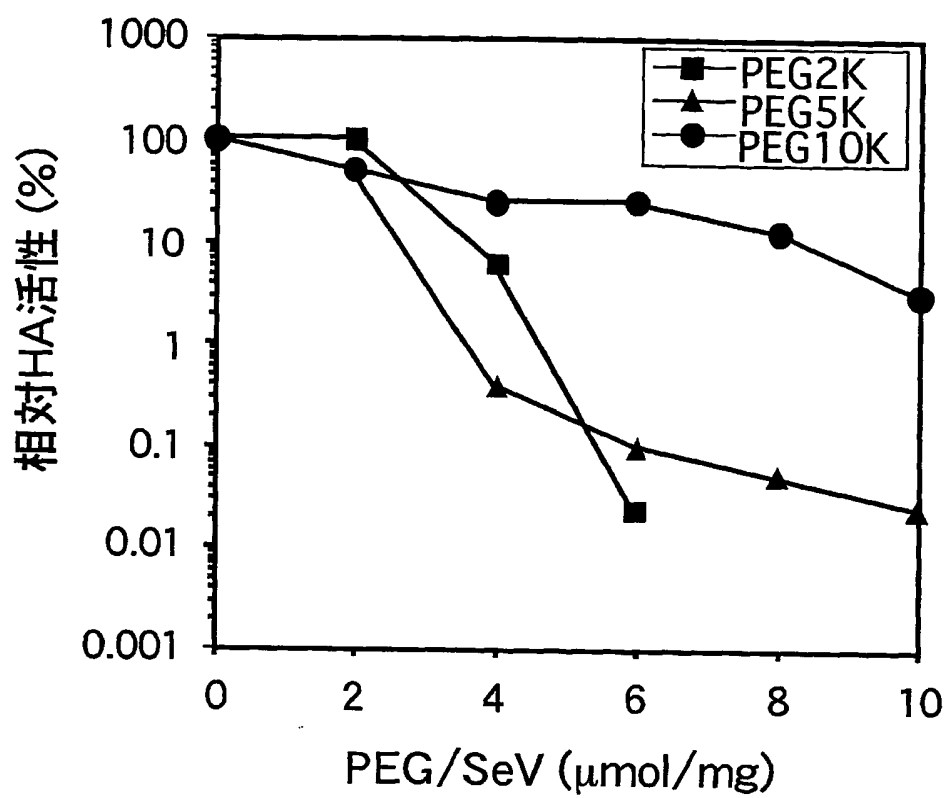
12/21

図 12



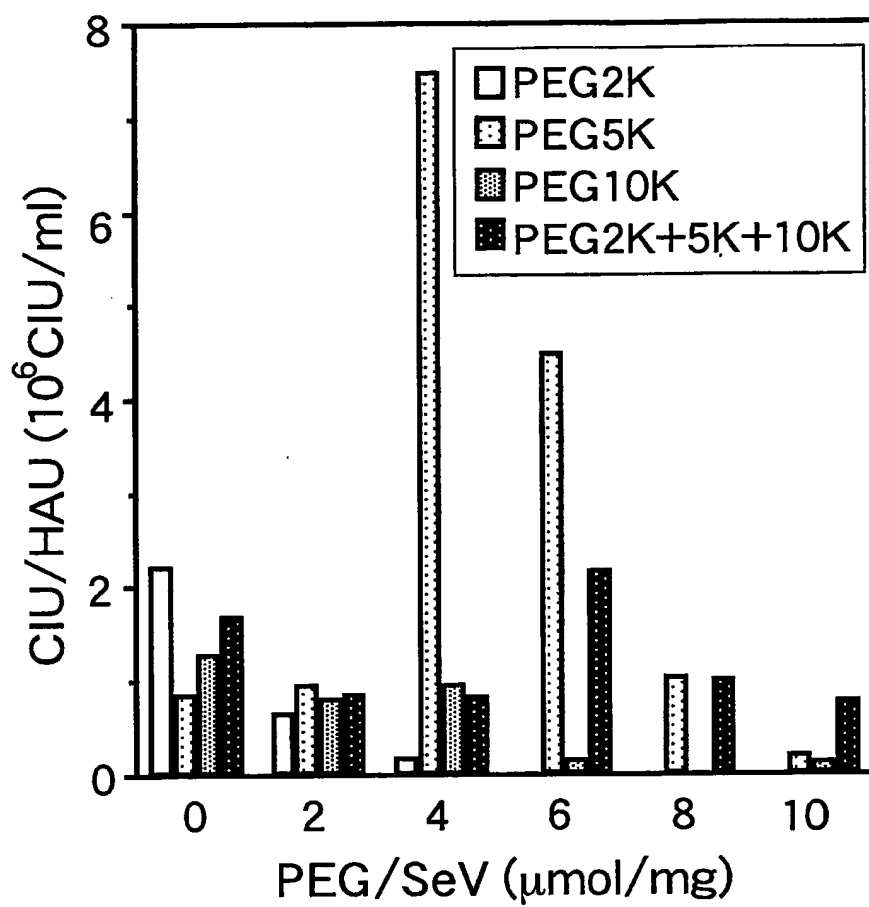
13/21

図13



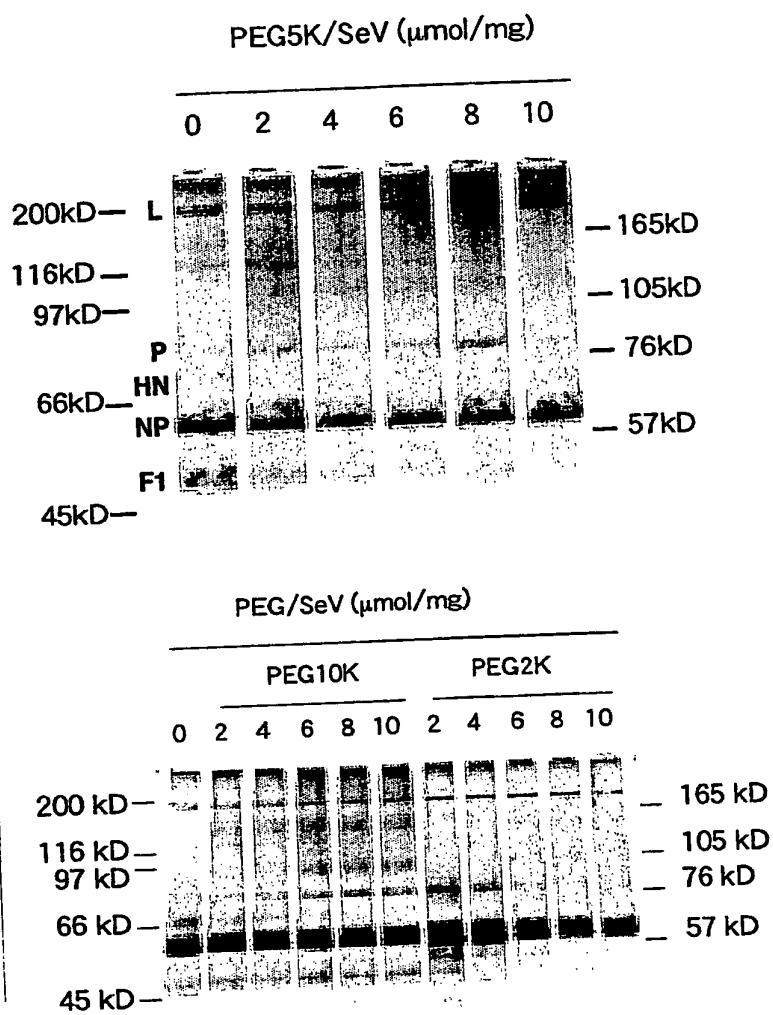
14/21

図 14



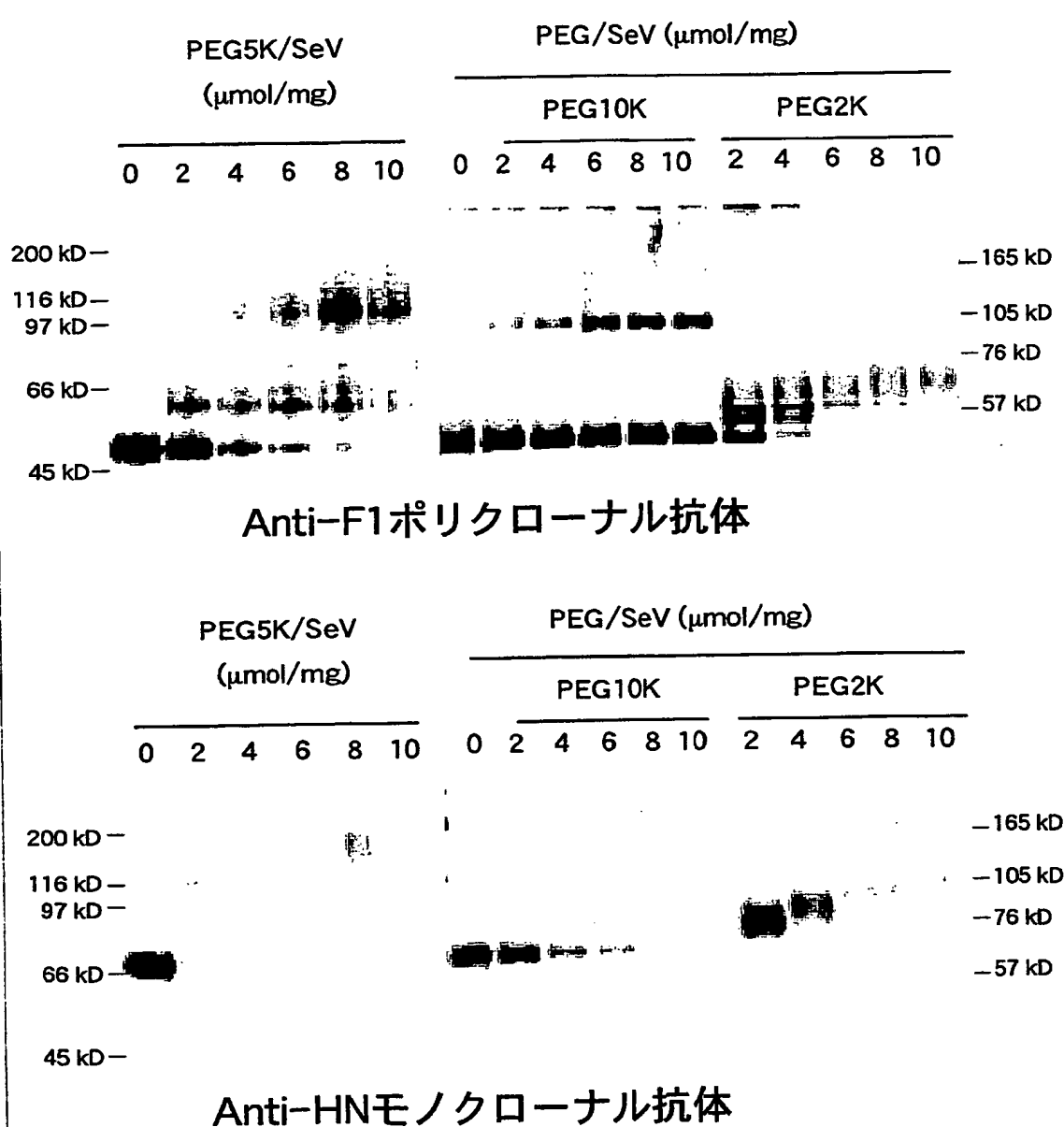
15/21

15



16 / 21

図 16



17 / 21

図 17

総粒子数(総蛋白量)を一定にした条件での比較

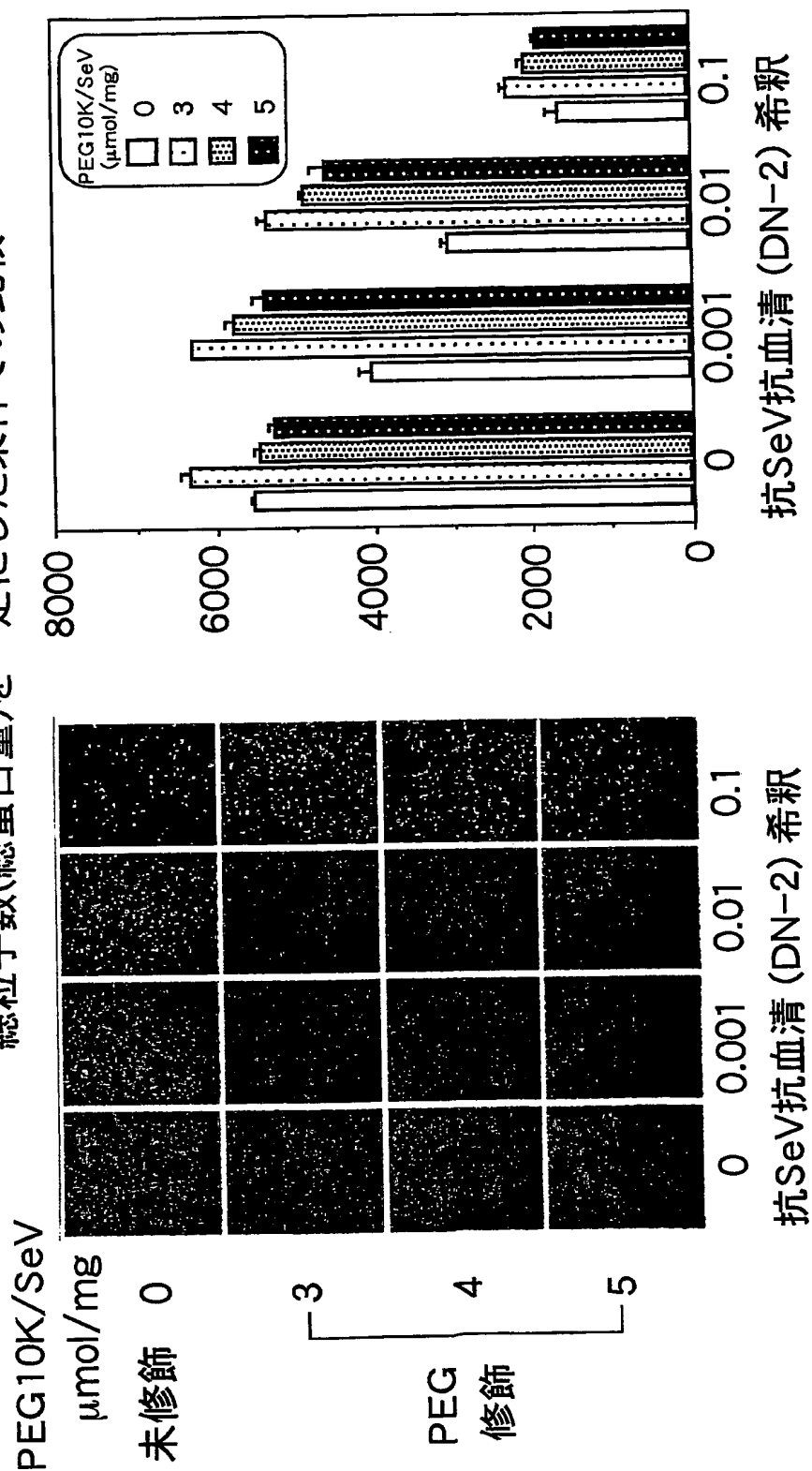




図 18

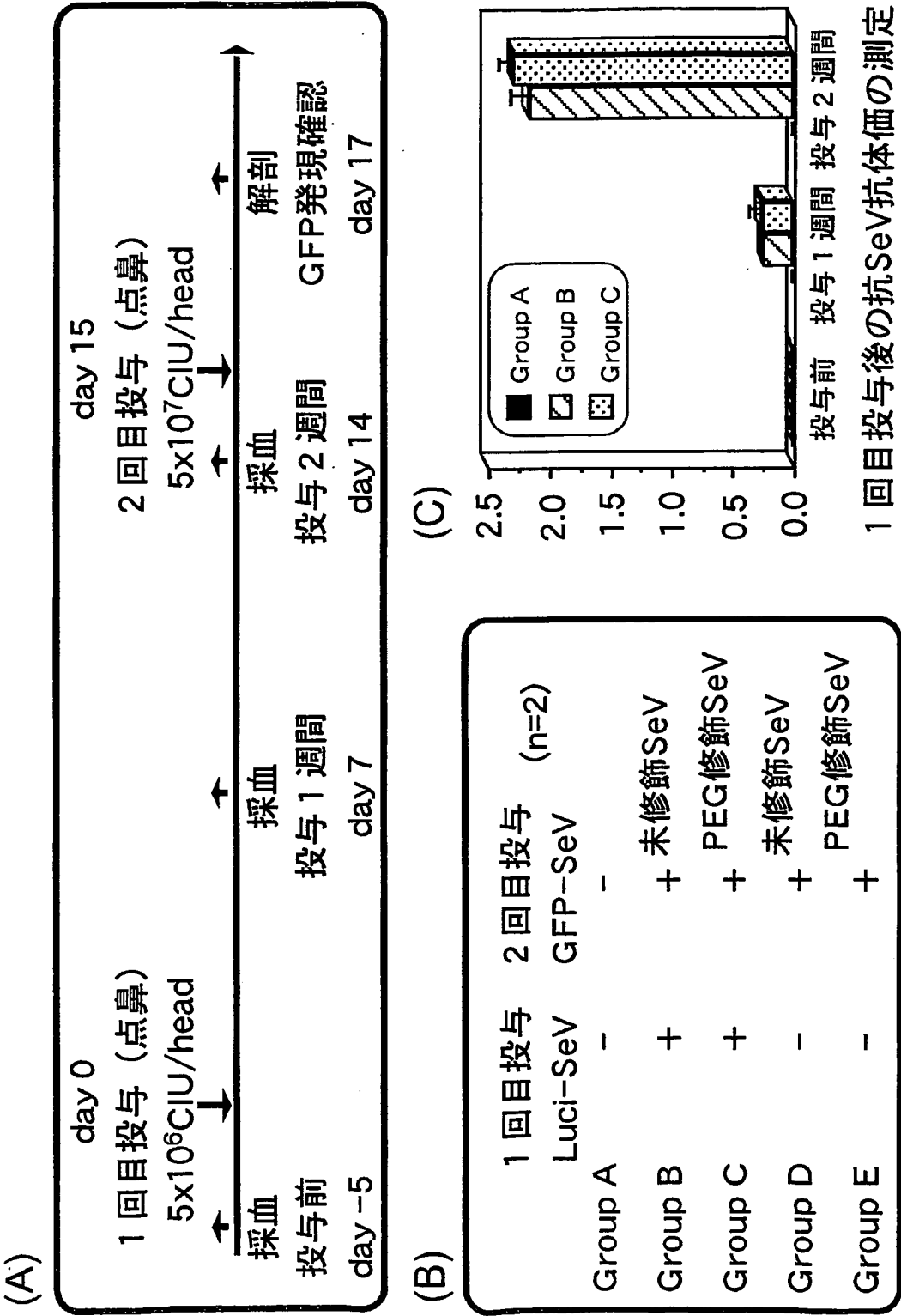
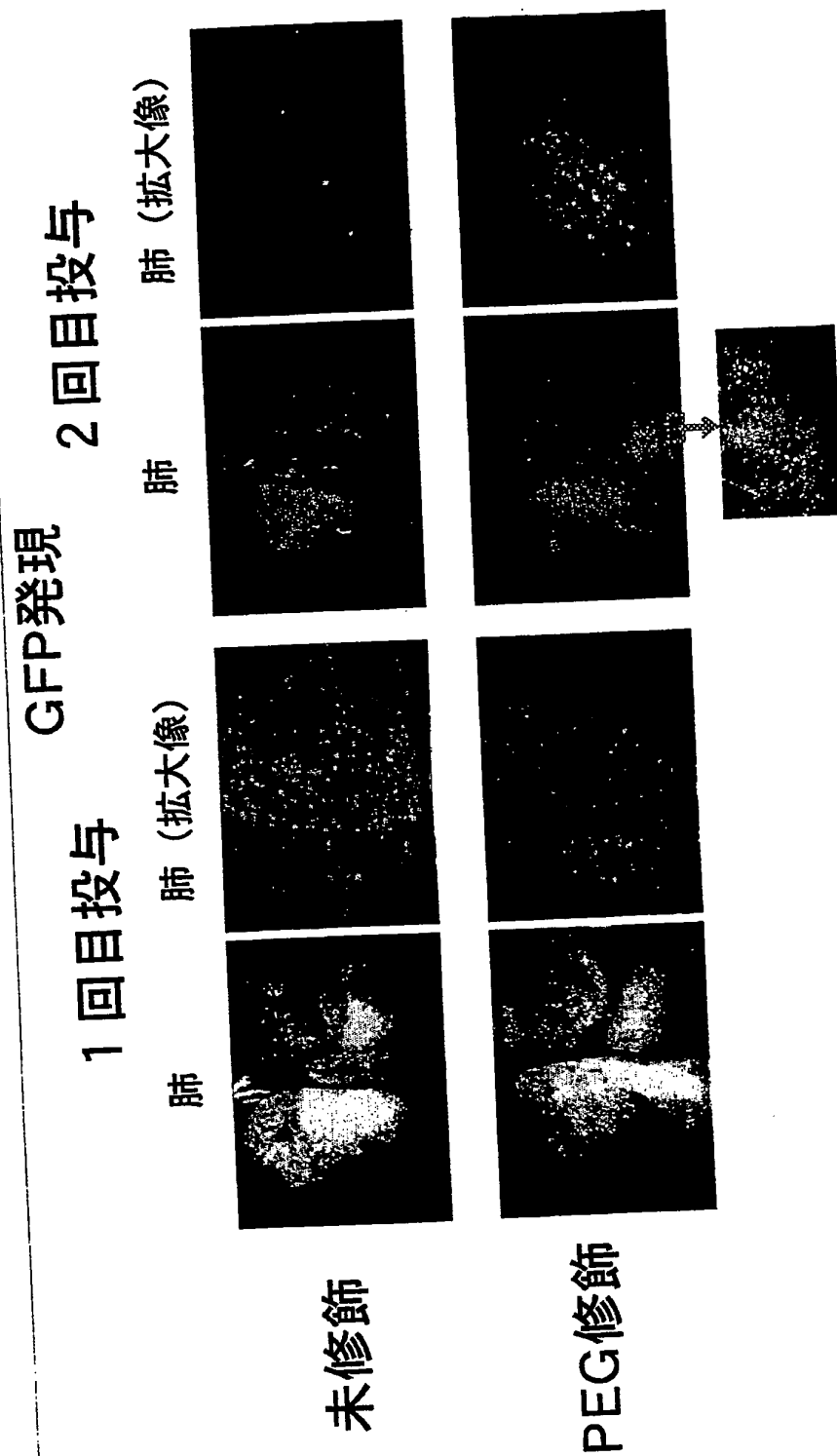


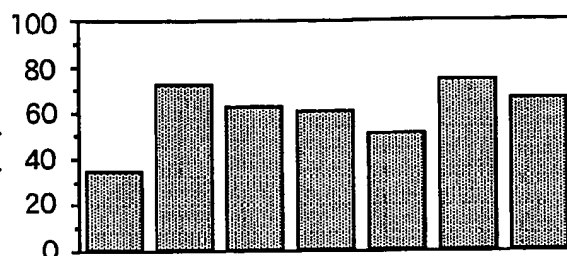
図19



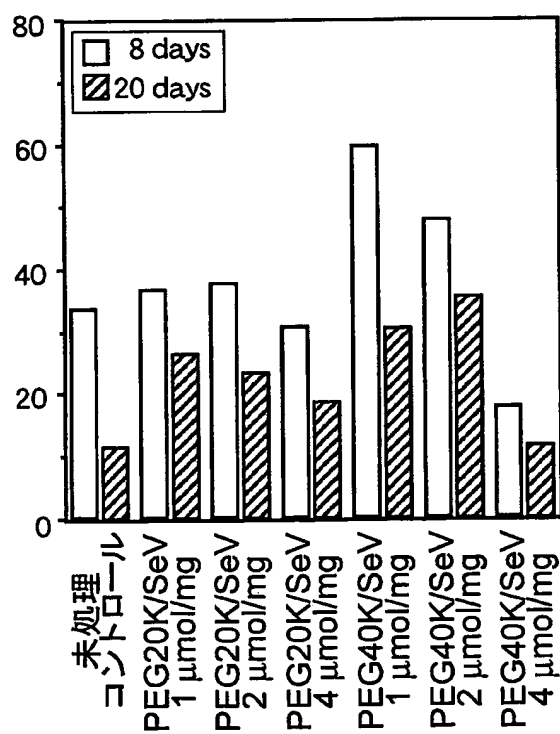
20 / 21

図 20

A

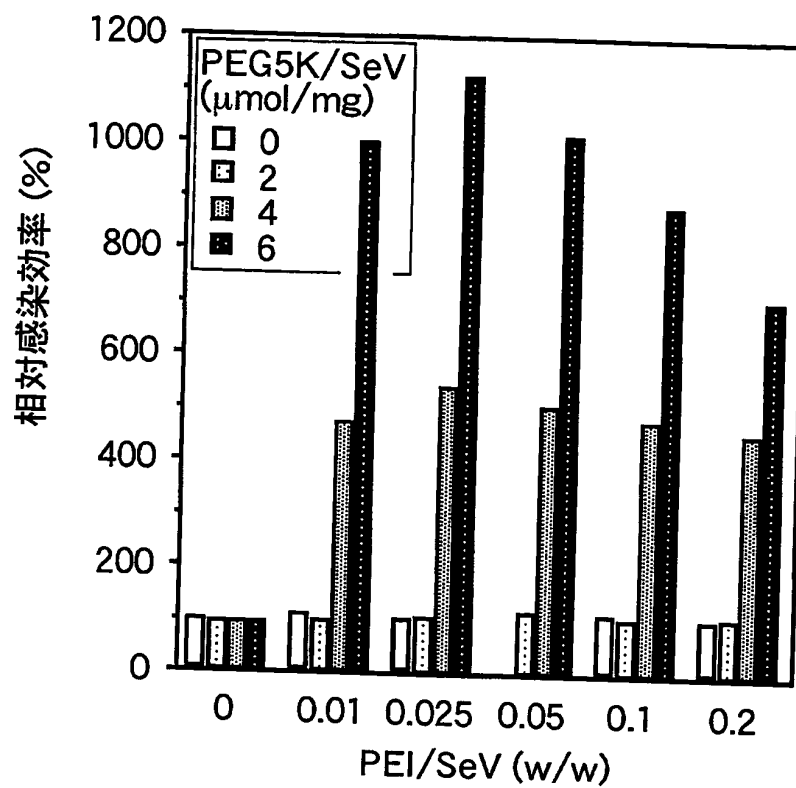
相対CIUパーセンテージ  
(%)

B

タイター (10<sup>8</sup> CIU/mg)

21 / 21

図 21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05527

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K47/48, 35/76, 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K47/48, 35/76, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1940-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/16171 A1 (Dनावेक Research Inc.), 09 May, 1997 (09.05.97), Claims 1 to 2; page 11, lines 7 to 25 (Family: none)	1-16
A	WO 00/27430 A2 (SCHWEIZ, SERUM- & IMPFINSTITUT BERN), 18 May, 2000 (18.05.00), Full text & JP 2002-529427 A	1-16
A	WO 01/32898 A2 (Dनावेक RESEARCH INC.), 10 May, 2001 (10.05.01), Claims 1 to 2 & JP 2003-513633 A	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search  
22 July, 2003 (22.07.03)

Date of mailing of the international search report  
05 August, 2003 (05.08.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05527

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A.G Gitman, Use of Virus-Attached Antibodies or Insulin Molecules To Mediate Fusion between Sandai Virus Envelopes and Neuraminidase-Treated Cells, Biochemistry, 1985, Vol.24, No.11, pages 2762 to 2768	17-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A61K47/48, 35/76, 48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A61K47/48, 35/76, 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1992年  
日本国公開実用新案公報 1971-1992年  
日本国登録実用新案公報 1994-1996年  
日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 97/16171 A1 (株式会社ディナベック研究所) 1997. 05. 09, 請求項1-2, 第11頁第7-25行 (ファミリーなし)	1-16
A	WO 00/27430 A2 (SCHWEIZ, SERUM-& IMPFINSTITUT BERN) 2000. 05. 18, 全文 & JP 2002-529427 A	1-16
A	WO 01/32898 A2 (DनावEC RESEARCH	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
22. 07. 03

国際調査報告の発送日  
05.08.03

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
伊藤 幸司

4C 3229

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	INC. ) 2001. 05. 10, 請求項1-2 & JP 2 003-513633 A  A. G. Gitman, Use of Virus-Attached Antibodies or Insulin Molecules To Mediate Fusion between Sendai Virus Envelopes and Neuraminidase-Treated Cells, Biochemistry, 1985, Vol. 24, No. 11, pages 2762-2768	17-21



## DESCRIPTION

PHARMACEUTICAL- OR GENE-CARRIER COMPOSITIONS WITH REDUCED  
HEMAGGLUTINATING ACTIVITY

5

Technical Field

The present invention relates to carriers for delivering pharmaceuticals or genes into cells, whose hemagglutinating activity is reduced by modifying an envelope protein of a minus-strand RNA virus.

10

Background Art

The Sendai virus (SeV) contains two types of envelope proteins: hemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion protein (F). HN binds to sialic acid on cell surface and followed by fusion mediated by F protein, allowing a direct, rapid, and highly efficient infection of SeV into cytoplasm. Furthermore, since sialic acid is present on almost all cell surfaces, SeV can infect a wide range of cells. In order to apply these kinds of extremely infective SeV to gene therapy, a recombinant SeV vector carrying various genes has been developed (Shiotani et al., Gene Therapy, 2001, 8, 1043-1050), and research is also progressing on a drug delivery system where genes and various pharmaceuticals are encapsulated in the aqueous core of liposomes which comprise SeV envelope proteins (Ramani et al., FEBS Letters, 1997, 404, 164-168; Isaka et al., Experimental Nephrology, 1998, 6, 144-147).

15

20

25

30

35

SeV vectors have many such advantages, however, their broad infectivity can also be a disadvantage. SeV vectors also fuse with erythrocytes which contain a large amount of sialic acid, triggering a high hemolytic activity. Thus, improvement is desired from the safety point of view. Furthermore, SeV vector fusion with erythrocytes means that the vector cannot deliver the required amount of pharmaceuticals to target cells, suggesting that SeV vector may be extremely unstable in blood. Therefore, methods for administering SeV vectors *in vivo* are

predicted to be confined to methods that do not mediate blood, such as temporarily stopping blood flow or perfusion methods, or to local administration methods for sites that are little influenced by blood components.

5        In order to resolve these safety- and stability-associated problems, the hemagglutinating activity of HN protein must be eliminated or decreased to reduce its binding with erythrocytes. However, eliminating hemagglutinating activity leads to reduced SeV binding to the target cells to be introduced with  
10        pharmaceuticals, which can be readily inferred to significantly reduce the efficiency of drug delivery. Therefore, some ingenuity is required.

      So far, there have been many reports of studies that eliminated hemagglutinating activity by specifically reducing  
15        the SeV HN protein with dithiothreitol (DTT). However, most of these studies have used hemolytic activity toward erythrocytes as an indicator. For example, Tomasi et al., in FEBS Letters, 1982, 143 (2), 252-256, reported that reducing SeV with DTT eliminates its hemagglutinating activity. However, they merely  
20        report that newly introducing erythrocyte-recognizing antibody molecules into SH groups (formed by DTT reduction) in HN protein molecules, complements the ability of SeV to bind to erythrocytes, exhibiting a revived hemolytic activity. Furthermore, since fusion activity is greatly reduced, doubts  
25        remain as to the possibilities of this method. Gitman et al., in Biochemistry, 1985, 24, 2762-2768, reported the chemical modification of SeV envelope proteins. They succeeded in eliminating hemagglutinating activity, but at the same time, they also eliminated fusion ability completely. They report  
30        that to confer fusion ability, an unmodified envelope protein must be newly incorporated, which leads to a revival of hemagglutinating activity.

      Several studies that target cells have been also reported. For example, Bagai et al., in Journal of Virology, 1993, 67 (6),  
35        3312-3318, proposed a drug delivery system for the sugar chain-specific infection of F protein, which comprises the steps of:

solubilizing SeVs whose HN has been reduced with surfactants; and reconstituting virions consisting only of F proteins. Ramani et al., in FEBS Letters, 1997, 404, 164-168, also reported the results of *in vitro* gene introduction using a similar system. Whilst these methods can indeed eliminate hemagglutinating activity and fuse SeV only with target cells, some problems remained to be solved. For example, F protein is also considerably reduced along with HN protein. Furthermore, not all of the envelope proteins are incorporated into virions in the reconstitution process (Ponimaskin et al., Virology, 2000, 269, 391-403), thus impairing the fusion ability of the reconstituted carriers and resulting in an increased dosage. Also, in the preparation process, the requirement of a large amount of virus, troublesome removal of surfactant, heterogeneity of the reconstituted virions, and such provide ample room for improvement.

Thus, hitherto there has been no known drug delivery system based on an envelope protein of a minus-strand RNA virus that has significantly reduced hemagglutinating activity but retains the ability to deliver drugs into cells.

#### Disclosure of the Invention

The objective of the present invention is to provide a carrier, in which only hemagglutinating activity is significantly reduced, and which retains the ability to introduce a pharmaceutical or gene into cells, by modifying an envelope protein in a minus-strand RNA virus.

In the development of pharmaceuticals and drug formulations, Drug Delivery System (DDS) is an important technique as a methodology to reduce undesirable effects and enable intended functions. The present inventors thought that chemically modifying a minus-strand RNA viral envelope protein, which is one DDS technique, can reduce activity against erythrocytes and retain the ability for introduction into cells. For this, it is preferable to selectively modify the envelope protein responsible for the hemagglutinating activity, to reduce the

activity while minimizing, as much as possible, the effect on the envelope protein critical to fusion.

The present inventors carried out exhaustive studies and discovered that modification with polymers such as polyethyleneglycol (PEG) effectively reduces hemagglutination. For example, in a PEG-modified SeV vector, obtained by covalently binding activated PEG to an amino group in the envelope protein of Sendai virus (SeV) (Fig. 1), a markedly reduced hemagglutination response (HAU) was apparent for the amount of PEG reacted. Although there was a concern that vector infectivity of target cells might also decrease along with the reduction of HAU, the degree of reduction in the ability of the modified vector to introduce genes into cells was small compared to that of HAU, confirming that sufficient vector infectivity was retained (Tables 1 and 2). In this case, it was revealed that a larger molecular weight of PEG can enhance the ability to introduce genes into cells. Furthermore, the method for preparing PEG-modified vector were very rapid and easy.

In the electrophoretic patterns of the constituent proteins of PEG-modified SeV vector, HN proteins drastically decreased and instead, new macromolecules were observed to appear. On the other hand, the decrease in F proteins was relatively small, suggesting that PEG preferentially modifies HN protein rather than binding to F protein. This was thus inferred to be a contributing factor in preserving fusion ability while drastically reducing HAU (Figs. 4, 15, and 16).

The hemolytic activity of PEG-modified SeV vector toward rat blood was significantly reduced as a reflection of reduced HAU, indicating this vector to be highly excellent from the safety point of view (Fig. 2). Furthermore, although the gene-introducing ability of the SeV vector was markedly reduced upon contact with the blood, the modified vector retained a sufficient level of gene-introducing ability even after the blood treatment (Figs. 3 and 20). These results indicate that modification not only has the effect of reducing binding to erythrocytes, but also, at the same time, can impart a

stabilizing effect on factors such as complements in blood, that are likely to destabilize vector activity. Furthermore, since the PEG-modified vector could actually introduce genes stably, even in the presence of a neutralizing antibody (Figs. 5 and 17),  
5 PEG modification was thought to impart stabilizing effects on various components of living body.

In addition, on examining the effect of PEG-modified vector administrated *in vivo*, the gene-introducing efficiency of this vector in multiple administrations was clearly higher than that  
10 of the unmodified vector, confirming that the PEG-modified vector has a high gene-introducing ability *in vivo* (Fig. 19).

As described above, it was found that appropriately selecting conditions of PEG modification could reduce the interaction of SeV vector with erythrocytes and yet retain a  
15 high level of gene-introducing ability into cells.

Furthermore, the present inventors also examined the use of a purified anti-HN protein monoclonal antibody (MAb), which selectively binds to envelope proteins responsible for hemagglutinating activities and reduces such activities (Miura  
20 et al., Exp. Cell Res., 1982, 141, 409-420). Sendai viral vectors treated with MAb showed no hemagglutination at all. Their hemagglutinating activity was completely blocked, and gene introduction into cells by the treated vector was not observed. When a target cell-binding ligand molecule was newly bound to  
25 the MAb molecule, Sendai viruses treated with this ligand-bound MAb (Fig. 5) showed neither hemagglutination nor hemolytic activity (Figs. 7, 10, and 11), and in spite of this, said treated viruses could introduce genes into potentially ligand-bound target cells with high efficiency (Figs. 8 and 9). Genes  
30 could not be introduced other than into target cells, and gene-introducing ability was eliminated in the presence of excess amounts of competitive substances (Table 4). These results prove that highly efficient gene introduction, exclusively into target cells, is possible despite the complete loss of the  
35 modified vector's hemagglutinating activity.

It is thought that this system may become applicable to introduction into various cells, by changing the ligand molecule, which is to be bound, into a molecule that responds to a receptor highly expressed on a target cell.

5 Furthermore, since this system can be readily prepared by mixing components just prior to use, it is very easy to use.

Such techniques can be also applied to virion formulations reconstituted from the constituent proteins of SeV envelope. In this case, it may not be necessary to reduce HN proteins as  
10 described above. If this technique is applied after solubilizing SeV without prior reduction and reconstituting virions that encapsulate required pharmaceuticals, carriers with greater fusion ability are formed with no effects on F protein due to reduction.

15 The present invention relates to pharmaceutical- or gene-carrier compositions whose hemagglutinating activity is reduced. More specifically, the present invention provides:

[1] a pharmaceutical- or gene-carrier composition which comprises a cell membrane comprising a minus-strand RNA virus  
20 envelope protein with hemagglutinating activity, wherein:

(a) a compound is added to the protein;  
(b) the hemagglutinating activity is reduced compared to a composition to which the compound is not added; and  
(c) the composition comprises the ability to introduce a  
25 pharmaceutical or gene into a target cell;

[2] the composition of [1], further wherein  
(d) hemolytic activity toward erythrocytes is reduced compared to a composition to which the compound is not added;

[3] the composition of [1] or [2], which comprises an  
30 infective virion of the minus-strand RNA virus;

[4] the composition of [1] or [2], which comprises an inactivated minus-strand RNA virus, or an envelope portion of the virus;

[5] the composition of any one of [1] to [4], wherein the  
35 minus-strand RNA virus is a *Paramyxoviridae* family virus;

[6] the composition of [5], wherein the *Paramyxoviridae* family virus is the Sendai virus;

[7] the composition of any one of [1] to [6], wherein the compound added to the protein has a molecular weight of 1,800 or  
5 more;

[8] the composition of [7], wherein the compound added to the protein has a molecular weight of 4,500 or more;

[9] the composition of [8], wherein the compound added to the protein has a molecular weight of 16,000 or more;

10 [10] the composition of any one of [1] to [9], wherein the compound added to the protein is polyethylene glycol;

[11] the composition of any one of [1] to [10], wherein the protein further forms a complex with polyethyleneimine;

[12] the composition of any one of [1] to [11], wherein the  
15 protein forms a complex with a cell-binding compound;

[13] the composition of [12], wherein the cell-binding compound is bound to the compound added to the protein;

[14] the composition of [12] or [13], wherein the compound added to the protein is an antibody that binds to the protein or  
20 fragment thereof;

[15] the composition of any one of [12] to [14], wherein the cell-binding compound is a ligand for a receptor on the cell surface;

[16] the composition of [15], wherein the ligand is folic  
25 acid;

[17] an antibody bound to a cell-binding compound, wherein the antibody binds to a minus-strand RNA virus envelope protein comprising hemagglutinating activity, or a fragment thereof;

[18] the antibody or fragment thereof of [17], which is  
30 F(ab')<sub>2</sub>;

[19] the antibody or fragment thereof of [17] or [18], wherein the cell-binding compound is a ligand for a receptor on a cell surface;

[20] the antibody or fragment thereof of [19], wherein the  
35 ligand is folic acid; and

[21] a pharmaceutical- or gene-carrier kit which comprises:

- (a) an antibody or fragment thereof which binds to a minus-strand RNA virus envelope protein comprising hemagglutinating activity, and to which a cell-binding compound is bound; and  
 (b) a pharmaceutical- or gene-carrier composition comprising the envelope protein.

The present invention provides pharmaceutical- or gene-carrier compositions which comprise a cell membrane containing a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, wherein: (a) a compound is attached to the protein; (b) the hemagglutinating activity is reduced compared to a composition to which the compound is not attached; and (c) the composition comprises the ability to introduce the pharmaceutical or gene into a target cell. The compositions of this invention are complexes that comprise a cell membrane containing a minus-strand RNA virus envelope protein having hemagglutinating activity. Such complexes may be, for example, infective virions, inactivated minus-strand RNA viruses, or complexes comprising the envelope components of disintegrated minus-strand RNA viruses, such as reconstituted liposomes.

Infective virions infect cells and thus deliver a pharmaceutical or gene encapsulated in the virus into those cells. In particular, by incorporating a foreign gene into a viral genome, the gene can be expressed from the viral genome in cells infected with the infective virions. The infective virus may be a replication-competent virus or a replication-deficient virus. The term "replication-competent virus" means that when a virus infects host cells, it is replicated within those host cells to produce infective virions.

Minus-strand RNA viruses can be reconstituted by transcribing viral genomic RNAs within cells, in the presence of viral proteins required for the transcription and replication of this genomic RNA. Recombinant minus-strand RNA viruses can be reconstituted using methods known in the art (WO 97/16539; WO 97/16538; WO 00/70055; WO 00/70070; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl.



Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell. M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466). With these methods, minus-strand RNA viral vectors, including parainfluenza viruses, vesicular stomatitis viruses, rabies viruses, measles viruses, rinderpest viruses, Sendai viruses, and such, can be reconstituted from DNAs.

The recombinant viral vectors containing foreign genes can be obtained by inserting the foreign genes into the viral vector genomes. Any gene to be expressed in a target cell can be used as a foreign gene. The foreign genes may be genes encoding naturally-occurring proteins, or genes encoding proteins modified from naturally-occurring proteins by deletion, substitution, or insertion of nucleotide(s), so long as the gene encodes a protein functionally equivalent to the naturally-occurring protein. Alternatively, the foreign gene may encode a deletion derivative of a naturally-occurring protein or synthetic protein. For example, for gene therapy or such, viruses are reconstituted by inserting a therapeutic gene for a target disorder into a DNA which serves as the viral vector template (viral vector DNA), and then transcribing the resulting recombinant DNA. When introducing a foreign gene into a viral vector DNA, for example, into Sendai viral vector DNA, a sequence consisting of a multiple of six nucleotides is preferably inserted between, for example, the transcription ending (E) sequence and the transcription starting (S) sequence (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830). In paramyxovirus or such, a foreign gene can be inserted upstream and/or downstream of the open reading frame (ORF) of the respective viral proteins (for example, ORFs of NP, P, M, F, HN,

and L proteins). In order to avoid inhibiting the expression of genes upstream and downstream of the foreign gene, the E-I-S sequence (transcription ending sequence - intervening sequence - transcription starting sequence) is appropriately inserted upstream or downstream of the foreign gene, so that the E-I-S sequence units are arranged between respective genes.

The recovered viruses can be purified until substantially pure. Purification can be carried out by purification/separation methods known in the art, including filtration, centrifugation, and column purification, or any combinations thereof. "Substantially pure" means that the virus accounts for the main proportion of a sample in which it exists as a component. Typically, a substantially pure viral vector can be identified by confirming that the proportion of the viral vector-derived protein is 50% or above of the total proteins comprised in the sample, preferably 70% or above, more preferably 80% or above, and further more preferably 90% or above. Examples of specific methods for purifying minus-strand RNA viruses are those using cellulose sulfate esters or cross-linked polysaccharide sulfate esters (Examined Published Japanese Patent Applications No. (JP-B) Sho 62-30752, JP-B No. 62-33879, and JP-B No. 62-30753), and those for adsorbing proteins to polysaccharides comprising fucose sulfate and/or degradation products thereof (WO 97/32010), and so on.

Inactivated viruses or reconstituted products from disintegrated viruses are used as transfection reagents for introducing a pharmaceutical or gene into cells. Minus-strand RNA viruses can be inactivated, for example, by UV irradiation. Furthermore, liposomes using inactivated viruses such as Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)-liposome can be prepared by vibration and ultrasonication (see, "Liposome in Life Science / Laboratory Manual", Springer-Verlag Tokyo (1992), pp. 282-287). Furthermore, a composition (membrane fusion liposome) formed by mixing inactivated Sendai virions or liposomes and nucleic acids has been reported (Yasushi Kaneda: BIOTHERAPY, 8, 1265 (1994)). Alternatively, disintegrated viruses can be reconstituted by,

for example, reconstituting liposomes from a solubilized virus to prepare so-called 'virosomes' (Bagai et al., (1993) Biochem. Biophys. Acta 1152, 15-25). Specifically, after solubilizing a minus-strand RNA virus with a surfactant such as Triton X-100, the insoluble RNP is removed by centrifugation. Virosomes can be prepared from reconstituted virions by removing the surfactant from the solubilized solution comprising the envelope and envelope proteins. Virosomes of uniform particle size can be collected by centrifugation (for example, at 12,000 rpm for ten minutes).

In a composition comprising infective virions, the infective virions may be either minus-strand RNA viruses or other viruses comprising a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity. Pseudotyped viruses, reconstituted with the envelope protein of another virus, are well known in the art (WO 01/92508). A pseudotyped virus comprising an envelope protein of a minus-strand RNA virus can be manufactured, for example, by preparing a virosome or such that comprises an inactivated minus-strand RNA virus or an envelope protein of the virus; and fusing the virosome with another virus. Alternatively, a pseudotyped virus can be prepared by expressing in the packaging cell of another virus, an expression vector that expresses a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity. Examples of viruses whose packaging cells are used to express the vector are retroviruses, specifically those belonging to the subfamily of oncoviruses comprising Moloney murine leukemia virus (MoMLV), murine stem cell virus (MSCV), and such (referred to as oncoviruses in this invention); and those belonging to the subfamily of lentiviruses, comprising human immunodeficiency virus (HIV) (e.g. HIV1 or HIV2), simian immunodeficiency virus (SIV), feline immunodeficiency virus (FIV), maedi-visna virus, equine infectious anemia virus (EIAV), caraparu arthritis encephalitis virus (CAEV), and such (referred to as lentiviruses in this invention). HIV-1 includes all the major (M) subtypes (including A to J), N, and outlier (O) (Hu, D. J. et al., JAMA

1996, 275: 210-216; Zhu, T. et al., Nature 1998, 5: 391(6667): 594-7; Simon, F. et al., Nat. Med. 1998, 4(9): 1032-7). Examples of isolated strains of SIV are SIVagm, SIVcpz, SIVmac, SIVmnd, SIVsnm, and SIVsyk. Retroviruses derived from a Spuma virus can also be used, including foamy viruses (DE 4318387; WO 9607749; Virology (1995) 210, 1, 167-178; J. Virol. (1996) 70, 1, 217-22). Viral vectors derived from foamy viruses can be utilized in the introduction of foreign genes into human cells, particularly in gene therapy, for the administration of recombinant vaccines and such.

In addition to the minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, pseudotyped viral vectors can further comprise, for example, other envelope proteins of the virus. For example, this invention comprises compositions comprising a pseudotyped viral vector comprising paramyxoviral HN and F proteins, in which a compound is attached to the HN protein. A viral vector comprising a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity can further comprise an envelope protein derived from another virus. As such a protein, for example, an envelope protein derived from a virus that can infect human cells is preferable. Such proteins are not particularly limited, and comprise, for example, the amphotropic envelope protein of retroviruses, G protein of vesicular stomatitis viruses (VSV), and such. Furthermore, examples of *Herpesviridae* proteins are gB, gD, gH, and gp85 proteins of herpes simplex virus; and gp350 and gp220 proteins of EB virus. Examples of proteins of *Hepadonaviridae* are S protein of hepatitis B virus. As a retroviral amphotropic envelope protein, for example, an envelope protein derived from murine leukemia virus (MuLV) 4070A strain can be used. Furthermore, the envelope protein derived from MuMLV 10A1 can also be used (e.g. pCL-10A1 (Imgenex), Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)). As an ecotropic envelope protein, for example, an envelope protein derived from Molony's murine leukemia virus (MoMuLV) can be used. As a vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G), for example, a protein derived from an

Indiana serotype strain thereof (J. Virology 39: 519-528 (1981)) can be used. Besides these, proteins derived from any preferable strains can also be used.

In this invention, minus-strand RNA viruses are viruses  
5 comprising a minus-strand (an antisense strand corresponding to the sense strand encoding the viral genes) RNA as the genome, and envelope proteins comprising hemagglutinating activity. Minus-strand RNAs are also referred to as negative strands. Examples of minus-strand RNA viruses are *Paramyxoviridae* Sendai  
10 viruses, Newcastle disease viruses, mumps viruses, and measles viruses; *Orthomyxoviridae* influenza viruses; and *Rhabdoviridae* vesicular stomatitis viruses and rabies viruses.

In this invention, viral envelope proteins with hemagglutinating activity are preferably the envelope proteins  
15 of single-stranded minus-strand RNA viruses. Single-stranded minus-strand RNA viruses are also referred to as non-segmented minus-strand RNA viruses, comprising viruses belonging to *Paramyxoviridae* (including paramyxoviruses, morbilliviruses, rubulaviruses, pneumoviruses, and such); *Rhabdoviridae*  
20 (including vesiculoviruses, lyssaviruses, ephemeroiruses, and such); *Firoviridae*; *Orthomyxoviridae* (including influenza viruses A, B, and C, thogoto-like viruses, and such); *Bunyaviridae* (including bunyaviruses, hantaviruses, nairoviruses, phleboviruses, and such) and viruses of *Arenaviridae*. Specific  
25 examples of envelope proteins with hemagglutinating activity are HN protein of *Paramyxoviridae*, HA protein of *Orthomyxoviridae*, HA protein of influenza virus, G1 protein of *Bunyaviridae*, G protein of *Rhabdoviridae*, VP1 protein of *Firoviridae*, and such.

In this invention, viral envelope proteins with  
30 hemagglutinating activity are more preferably derived from paramyxoviruses. "Paramyxoviruses" refer to viruses belonging to *Paramyxoviridae*. Paramyxoviruses includes, for example, paramyxoviruses, morbilliviruses, rubulaviruses, pneumoviruses, and metapneumoviruses; specific examples being Sendai virus,  
35 Newcastle disease virus, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus, rinderpest virus, distemper virus, simian

parainfluenza virus (SV5), human parainfluenza virus types 1, 2, and 3, and such. A specific example of a paramyxovirus envelope protein with hemagglutinating activity is HN protein (also referred to as H protein). In this invention, viral envelope proteins with hemagglutinating activity are more preferably those of viruses belonging to a *Paramyxoviridae* subfamily, including paramyxoviruses, morbilliviruses, and rubella viruses, and further more preferably paramyxovirus viral envelope proteins. The viral envelope proteins with hemagglutinating activity are most preferably the Sendai virus HN protein. These viruses can be derived from wild strains, mutant strains, laboratory-passaged strains, and artificially constituted strains. For example, HN protein derived from Sendai virus Z strain can be preferably used. Nucleotide sequences of Sendai virus HN gene are registered at GenBank accession Nos. D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131, etc.

Furthermore, as an envelope protein with viral hemagglutinating activity, HA proteins of viruses belonging to *Orthomyxoviridae* are also preferably used. For example, pseudotyped viruses produced using an envelope protein expression plasmid of the influenza virus can infect a wide range of mammalian cells, including human cells. An envelope protein of influenza virus derived from a preferable isolated strain can be used. In the budding of influenza viruses, neuraminidase plays a role in cleaving the bond between HA protein and sialic acid. Therefore, in preparing HA pseudotyped viruses, infective viruses can be obtained by treating the viruses with neuraminidase before, while, or after attaching a compound to HA. Alternatively, by preparing a viral vector that coexists with a protein having neuraminidase activity, the bond with sialic acid can be automatically cleaved. In this case, a viral envelope protein with neuraminidase activity, such as HN protein of paramyxovirus in particular, is preferably used. Thus, the present invention provides compositions with reduced viral hemagglutinating activity comprising a pseudotyped viral

vector containing both HA protein of an *Orthmyxoviridae* virus and HN protein of a *Paramyxoviridae* virus, in which a compound is attached to either one or both of the proteins.

5 The viral envelope proteins may be intact proteins derived from wild-type viruses, or naturally or artificially mutated proteins. For example, it is possible to analyze antigen-presenting epitopes or the like as potential cell surface antigen molecules in these envelope proteins, and then use these epitopes to construct viruses using proteins with lowered  
10 antigen-presenting ability. Furthermore, it is also possible to use envelope proteins and such derived from attenuated strains of pathogenic viruses.

For example, using viral envelope proteins with hemagglutinating activity and other envelope proteins whose  
15 cytoplasmic domains have been modified by deletion, substitution, and/or addition of amino acid residues, vectors with higher gene-introducing ability can be constructed. The present invention relates to compositions comprising viral vectors that comprise a naturally-occurring viral envelope protein with  
20 hemagglutinating activity whose partial or whole cytoplasmic domain is modified by substitution, deletion, and/or addition of amino acid residues, in which a compound is attached to the viral envelope protein with hemagglutinating activity. Specifically, for example, modified proteins obtained by  
25 deleting the cytoplasmic domain of HN protein of paramyxovirus, or by substitution or addition in the cytoplasmic domain of other membrane proteins (such as envelope proteins of retroviruses including lentiviruses) are preferably used for producing pseudotyped retroviral vectors with high infection  
30 efficiencies.

In this invention, hemagglutinating activity means the activity of causing hemagglutination (HA), that is, the activity of agglutinating erythrocytes. Hemagglutinating activity can be examined by methods known in the art (Kokuritsu Yobou Eisei  
35 Kenkyujo Gakuyukai, ed. Second edition, "Virus Experiments", Introduction, pp. 214-225, Maruzen Co., Ltd.). For example,

erythrocytes derived from chickens (including chicks and adult chickens), geese, rats, guinea pigs, rhesus monkeys, green monkeys, or humans are available. Reactions are performed under suitable conditions, depending on the proteins, such as at 0°C, 5 4°C, room temperature, or 37°C. Specifically, hemagglutinating activity can be measured, for example, by the "end-point dilution method" (Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Yonemitsu, Y. and Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker 10 AH. *Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press*: pp. 295-306, 1999).

Compounds are attached to the minus-strand RNA virus envelope proteins with hemagglutinating activity in the compositions of this invention, wherein hemagglutinating 15 activity is reduced compared to when the compound is not attached. In this invention, the term "reduced hemagglutinating activity" means significantly reduced hemagglutinating activity, and comprises, for example, activity that is reduced statistically significantly (e.g. a significance level of 5% or 20 more), and also, completely eliminated activity (or activity below the detectable level). The hemagglutinating activity of the compositions of this invention is preferably reduced to 1/2 or less of that of a control composition to which the compound is not attached, more preferably to 1/3 or less, more preferably 25 to 1/5 or less, more preferably to 1/10 or less, more preferably to 1/20 or less, more preferably to 1/50 or less, more preferably to 1/100 or less, more preferably to 1/200 or less, more preferably to 1/500 or less, and more preferably to 1/1000 or less. In contrast, the ability of the compositions of this 30 invention to introduce a pharmaceutical or gene into cells is maintained at a high level compared to the decrease in hemagglutinating activity. That is, when compared to a control composition to which a compound is not attached, the ability of a composition of this invention to introduce a pharmaceutical or 35 gene into a cell is reduced by a smaller degree, or, more preferably, not reduced but rather elevated.



Furthermore, the hemolytic activity of the compositions of this invention is also preferably significantly reduced. Hemolytic activity can be detected by attaching a test composition to blood; leaving the mixture to stand; centrifuging  
5 to remove blood cell components; and then measuring the absorbance of the eluted hemoglobin (see Examples). The hemolytic activity of the compositions of this invention is reduced preferably to 70% or less of that of a control composition to which a compound is not attached, more preferably  
10 to 60% or less, more preferably to 1/2 or less, more preferably to 1/3 or less, more preferably to 1/5 or less, more preferably to 1/10 or less, more preferably to 1/20 or less, and more preferably to 1/50 or less.

The hemagglutinating activity of the compositions of this  
15 invention is reduced, and, in a preferred embodiment, their hemolytic activity is also decreased; however their ability to introduce a pharmaceutical or gene into the cells is retained. For example, compositions comprising a minus-strand RNA virus or the envelope component of the virus can fuse with the cell  
20 membrane of target cells, delivering a pharmaceutical or gene into the cells. A cell membrane fusion ability means the ability to incorporate constituent components into a cell after a complex (carrier) comprised in the composition of this invention has adhered to the cell membrane, using the fusion  
25 activity of the complex. This activity is due to the function of fusion (F) protein, which causes cell fusion and is comprised in the envelope of minus-strand RNA viruses. The cell membrane comprised in the compositions of this invention preferably comprises F protein of a minus-strand RNA virus, in addition to  
30 the envelope protein with hemagglutinating activity to which a compound is attached.

The ability to fuse with cells can be detected by methods such as: (1) using erythrocyte hemolysis as an indicator; (2) incorporating a fluorescent substance into the membrane and  
35 using changes in fluorescence intensity due to dilution by membrane flux during fusion; or (3) encapsulating a

pharmaceutical into the aqueous core of a liposome as a cell membrane model, and using leakage of the pharmaceutical as an indicator.

Furthermore, when the compositions of this invention are  
5 prepared as pseudotyped viruses from other viruses, such as  
those of *Retroviridae* as described above, the compositions are  
still capable of introducing a pharmaceutical or gene comprised  
within the virus into cells, due to envelope proteins of the  
10 respective viruses. An ability to introduce a pharmaceutical or  
gene into cells can be confirmed by detecting the pharmaceutical  
or gene. A pharmaceutical can be detected, for example, by  
detecting the uptake of a labeled pharmaceutical into cells, or  
by introducing a biologically active substance into cells and  
15 examining changes in cellular characteristics caused by that  
substance. On the other hand, expression of a gene within the  
cells can be detected at the RNA level or protein level, by  
methods such as PT-PCR, Northern blotting hybridization,  
immunoprecipitation, Western blotting, and such. Alternatively,  
20 a gene encoding a biologically active protein can be  
incorporated into cells, and changes in cellular characteristics  
caused by that protein can be measured.

Furthermore, the stability of the compositions of this  
invention in blood is preferably significantly elevated.  
Elevated stability in blood means a smaller degree of decrease  
25 in the composition's ability to deliver a pharmaceutical or gene  
when a composition of the present invention is placed in blood.  
The smaller the decrease in the delivery capability of the  
composition, the higher the composition's stability is in blood.  
Elevation of stability in blood can be detected by incubating a  
30 composition of this invention with blood; measuring the post-  
incubation level of a pharmaceutical or gene delivered by the  
composition; and comparing the level with that obtained by a  
control composition to which the compound is not attached (see  
Examples). Delivery capability may be referred to as the  
35 activity of a pharmaceutical in the case of pharmaceuticals, and  
as the expression level of a gene in the case of genes. Gene

expression can be determined, for example, by directly or indirectly detecting the transcription product (mRNA) or translation product (protein). A biologically active protein can be detected by measuring the activity of the protein. The degree of decrease in the ability of a composition of this invention to deliver a pharmaceutical or gene is preferably reduced to 70% or less of that of a control composition to which the compound is not attached, more preferably to 60% or less, more preferably to 1/2 or less, more preferably to 1/3 or less, more preferably to 1/5 or less, more preferably to 1/10 or less. Compared to an unmodified control composition, it is desirable that the capability of a composition of this invention to deliver a pharmaceutical or gene is elevated relative to its hemagglutinating activity.

In this invention, the phrase "a compound is attached to the envelope protein having hemagglutinating activity" means that the protein is bound to the compound. The binding may be a covalent or noncovalent bond. Examples of noncovalent bonds are hydrogen bonds, coordinate bonds, ionic bonds, hydrophobic interactions (hydrophobic bonds), and intermolecular force (van der Waals forces). The protein and the compound may initially exist separately, and the compound may be attached to the protein via bonding. A compound can be attached to the envelope protein having hemagglutinating activity by, for example, forming covalent bonds by cross-linking. The crosslinks can be formed with any preferred functional groups. Functional groups include, for example, hydroxyl groups, amino groups, aldehyde groups, carboxyl groups, thiol groups, silanol groups, amide groups, epoxy groups, succinylimide groups, phenol groups, and such, but are not limited thereto. Examples of covalent bonds are ester bonds, ether bonds, amino bonds, amide bonds, sulfide bonds, imino bonds, disulfide bonds, etc. The protein and the compound are preferably bound with a non-peptide bond. Methods for forming covalent bonds include cyanogen bromide activation methods, acid azide derivative methods, condensing agent methods, diazotization methods, alkylation methods, etc.

The pharmaceutical- or gene-carrier compositions of this invention can be produced by a method comprising the steps of: contacting a compound with a minus-strand RNA virus envelope protein having hemagglutinating activity; and binding the  
5 protein with the compound. The compound is bound to the envelope protein at its domain exposed on the viral surface. Therefore, specifically, the step of contacting the compound with the protein is preferably performed by contacting the compound with virions comprising that protein. Thus, the  
10 compound can be specifically attached to a protein involved with the hemagglutinating activity by a domain that is exposed on the viral surface. In particular, this invention reveals that even in the presence of other envelope proteins, the compound will preferentially attach to the envelope protein with  
15 hemagglutinating activity on the viral surface via compound crosslinking, significantly reducing hemagglutinating activity. Therefore, it is possible to easily produce a virus in which a compound is attached to the envelope protein having hemagglutinating activity, for example, by the steps of:  
20 attaching a compound produced by usual methods to a virus to which a compound is not attached; and then binding the compound to the virus.

Compounds to be attached to the envelope protein having hemagglutinating activity are not limited, as long as they can  
25 significantly inhibit the hemagglutinating activity of the protein. It is preferable that these compounds have no significant biological toxicity, and are chemically stable after the protein attachment. Also, the compounds are non-antigenic, or have low antigenicity. Furthermore, the compounds to be  
30 attached are preferably water-soluble. In order to effectively inhibit the hemagglutinating activity, the molecular weights of the compounds are preferably 1,600 Daltons (Da) or higher, more preferably 1,800 or higher, more preferably 1,900 or higher, and more preferably 2,000 or higher. Particularly preferable  
35 compounds have a molecular weight of 2,800 Da or higher, more preferably 3,800 or higher, more preferably 4,300 or higher,

more preferably 4,500 or higher, and more preferably 5,000 or higher. In particular, compounds with a molecular weight of 12,000 Da or higher, more preferably 14,000 or higher, more preferably 15,000 or higher, more preferably 16,000 or higher, more preferably 18,000 or higher, and more preferably 20,000 or higher can remarkably inhibit hemagglutinating activity.

The compounds to be attached may be various polymers such as organic compound polymers. They may also have an uneven molecular weight distribution, in which case the phrase "molecular weight of a compound to be attached" used herein means an average molecular weight. The distribution of molecular weight (MW/Mn) value is preferably small, for example, 5 or less, preferably 3 or less, more preferably 2 or less, more preferably 1.6 or less, and more preferably 1.4 or less.

Specifically, the natural polymers can be, for example, proteins such as antibodies, albumin, collagen, gelatin, fibrin, lectin, and heparin, or fragments thereof; polysaccharides such as dextran, cyclodextrin, dextran sulfate, cellulose, chitin, chitosan, and alginic acid; and lipids. As the synthetic polymers, polylactic acid, polylysine, polystyrene, pyran polymer, polyglutamic acid, polyacrylamide, polyvinyl alcohol, polyethyleneglycol, styrene-maleic acid copolymer, lysine-glutamic acid copolymer, polyhydroxyethyl methacrylate, Ficoll, and such can be used.

The compound to be attached is exemplified by a polyethyleneglycol (PEG) in particular (J.M. Harris, "Polyethylene Glycol Chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications", Plenum, New York, NY, 1992; J.M. Harris and S. Zalipsky, "Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol", ACS Books, Washington, D.C., 1997). PEGs are preferably used because of their water solubility, and low or non-toxicity. "PEG" represents compounds comprising the following structure:



wherein, n is a natural number of 2 or more.

For example, a typical PEG is exemplified by compounds comprising the following structure:



wherein, n is a natural number of 2 or more.

5

PEGs can comprise any desired modified derivatives, for example, in which a hydroxyl group or such is substituted in the terminal of the above structure. For example, monomethylether (mPEG), in which a hydroxyl group on one end of the main chain has been substituted, is preferably used in this invention. PEGs may be linear or branched. For example, PEGs comprising one, two, three, or more side chains can be used. These side chains may comprise the ethyleneglycol structure. PEGs of various molecular weights are available. For example, PEG2000 (average molecular weight: 2000), PEG3000 (average molecular weight: 3000), PEG4000 (average molecular weight: 4000), PEG5000 (average molecular weight: 5000), PEG8000 (average molecular weight: 8000), PEG10000 (average molecular weight: 10000), or PEG20000 (average molecular weight: 20000) can be preferably used. By using a PEG that comprises a functional group for cross-linkage, the PEG can be attached to the envelope protein having the hemagglutinating activity.

For example, a PEG comprising a primary amino group on its terminus can be cross-linked with an acylation reagent (Buckmann, A. et al (1981) Makromol. Chem. 182:1379; Zalipsky, S. et al (1983) Eur. Polym. J. 19: 1177; Eidelman, O. et al (1991) Am. J. Physiol. 260 (Cell Physiol 29): C1094; Pillai, V.N.R. et al (1980) J. Org. Chem. 45:5364). Alternatively, PEG can be simply cross-linked using an N-hydroxysuccinimide (NHS)-activated ester, activated carboxylic acid, activated aldehyde, or such. Specific examples of PEG-carboxylic acid NHS esters are PEG-succinimidyl succinate, PEG-succinimidyl carbonate, PEG-succinimidyl propionate, and PEG-succinimidyl butanoate (Olson, K. et al, (1997) J. M. Harris & S. Zalipsky Eds., Poly(ethylene glycol), Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, ACS, Washington, DC.; Harris, J. M. and Kozlowski, A., US Patent No.

35

5,672,662). Furthermore, benzotriazole carbonate derivatives of PEG form a stable urethane bond with protein amino groups (Dolence, Eric K., US Patent No. 5,650,234). A PEG comprising an aldehyde group on its terminus can be also used. Aldehyde groups can react with amines under milder conditions than for NHS ester. For example, PEG-propionaldehyde can be preferably used (Harris, J.M. et al (1984) J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 22: 341; Kinstler, Olaf B. et al., U. S. Patent 5,824,784; Wirth, P. et al (1991) Bioorg. Chem. 19: 133). Furthermore, a maleimide derivative of PEG can be cross-linked to a thiol group (Goodson, R.J. & Katre, N.V. (1990) Bio/Technology 8: 343; Kogan, T.P. (1992) Synthetic Comm. 22, 2417). Carboxymethyl-NHS derivatives, norleucine-NHS derivatives, tresylate derivatives, epoxide derivatives, carbonylimidazole derivatives, and PNP carbonate derivatives of PEG can be also used. In particular, PEG tresylate and PEG succinimidyl propionate can be preferably used.

The compound can be bound, for example, by preparing virions comprising an envelope protein with hemagglutinating activity at a concentration of about 1 mg protein/ml, and attaching the compound preferred to be attached at about 0.1 to 100 mg (preferably about 1 to 50 mg) to the virions. For example, by reacting SPA-PEG5K (1 to 5 mg) or SPA-PEG20K (about 10 to 20 mg) with the virus (1 mg protein) in a buffer solution (pH8.5), it is possible to significantly reduce the hemagglutinating activity of the virus and yet maintain the ability of the virus to introduce a pharmaceutical or gene into cells. Since the attachment of a compound to the protein may be affected by reaction conditions, such as the amount of the compound used in the reaction, conditions are appropriately adjusted so as to significantly reduce the hamagglutinating activity and maintain the ability to introduce a pharmaceutical or gene into cells.

For example, when attaching a compound to a minus-strand RNA virus, the ratio of the amount of compound to virus, expressed as the molar amount of the compound and the protein

weight of the virus, can be set at 1 to 10  $\mu\text{mol/mg}$  protein (compound:virus ratio), more preferably 2 to 8  $\mu\text{mol/mg}$  protein, and further more preferably 3 to 8  $\mu\text{mol/mg}$  protein, for example, about 4  $\mu\text{mol/mg}$  protein.

5        To avoid loss of the ability to introduce a pharmaceutical or gene into cells, the molecular weight of a compound to be attached is preferably 100,000 Da or less, more preferably 80,000 or less, more preferably 60,000 or less, and more preferably 50,000 or less. Particularly, compounds with a  
10        molecular weight of 40,000 Da or less, more preferably 35,000 or less, more preferably 30,000 or less, more preferably 25,000 or less, more preferably 20,000 or less, are preferable to maintain the introducing ability and specifically reduce hemagglutinating activity.

15        As shown in Example 28, when modifying the hemagglutinin protein, the ability to introduce a pharmaceutical or gene was revealed to be even further enhanced by further modifying the protein with an aliphatic polyamine, such as a polyethyleneimine (PEI). "PEI" stands for compounds comprising the following  
20        structure:



wherein,  $n$  is a natural number of 2 or more.

For example, attaching PEI to the PEG-modified derivative of a minus-strand RNA virus can enhance its gene-introducing  
25        ability significantly. In this case, the ratio of the amount of PEI to virus, expressed as the weight of the compound and the protein weight of the virus, can be set at 0.001 to 1 (compound/virus ratio), more preferably 0.01 to 0.2, and more preferably 0.01 to 0.1. PEI comprising an average molecular  
30        weight of, for example, 25 kDa to 750 kDa can be preferably used, but is not limited thereto.

Furthermore, in this invention, it was found that even when the efficiency of pharmaceutical or gene introduction is reduced or lost upon attachment of a compound to a hemagglutinin protein,  
35        this introduction efficiency can be retained by attaching a compound with cell-binding activity to a complex comprising this



protein. Thus, it has become possible to prepare the pharmaceutical- or gene-carrier compositions of this invention without limiting the molecular weight of the compound to be attached to the envelope protein. The present invention

5 provides pharmaceutical- or gene-carrier compositions comprising a cell membrane containing a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, wherein: (a) a compound is attached to the protein; (b) hemagglutinating activity is reduced compared to a composition to which the compound is not

10 attached; (c) the composition comprises a complex formed from the protein together with a compound comprising cell-binding activity; and (d) the composition has the ability to introduce a pharmaceutical or gene into target cells. Even when a compound is bound to the envelope protein to inhibit hemagglutinating

15 activity and gene introduction, it is possible to inhibit hemagglutinating activity and yet maintain gene introduction ability by further incorporating a ligand in to the compound. A "ligand" is a compound that binds to a receptor on the cell surface, activating the receptor function. For example, when

20 using an antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment (MW: about 50 kDa), keeping down the amount of binding antibody fragment can retain a gene-introducing ability of the viral vector relative to the residual hemagglutinating activity. However, even when hemagglutinating activity is completely inhibited, a vector's gene-introducing

25 ability can be dramatically enhanced by binding the antibody with a ligand (folic acid) having cell-binding activity (see Examples).

Forming a complex between a compound having cell-binding activity and an envelope protein with hemagglutinating activity

30 means that the compound and the protein bind to each other directly or indirectly (for example, via another compound), by a covalent or non-covalent bond. Bonds may be either covalent or non-covalent. For example, a composition may comprise a cell membrane comprising an envelope protein having hemagglutinating

35 activity and a compound having cell-binding activity. The compound with cell-binding activity must be exposed on the

surface of the complex. For example, when the complex is a virion, the protein and the compound may exist on the viral envelope surface. Alternatively, when the complex is a liposome, the protein and the compound may exist on the surface of the liposome. In order to bind a compound with cell-binding activity to the complex, for example, the compound can be cross-linked to a desired envelope protein comprised in the complex, or preferably to an envelope protein with hemagglutinating activity. Cross-links can be formed using a desired functional group in a similar way to that described above. Alternatively, if the compound is a protein, it can be expressed as a membrane protein in the envelope, or as a fusion protein with an envelope protein comprised in the complex. In a preferred embodiment, a compound with cell-binding activity binds directly to the compound attached to the envelope protein with hemagglutinating activity, through a covalent or non-covalent bond. The compound with cell-binding activity can also be the same compound that is attached to the envelope protein with hemagglutinating activity. The present invention relates to methods for producing pharmaceutical- or gene-carrier compositions which comprise a cell membrane comprising a minus-strand RNA virus envelope protein having reduced hemagglutinating activity, wherein the method comprises the steps of: (a) contacting a compound with the protein; and (b) binding the protein and the compound; and further (i) attaching a compound with cell-binding activity to the compound. Step (i) may be performed before step (a), or simultaneously with step (a) or step (b), or in between step (a) and step (b), or after step (b). Step (i) is preferably performed before step (a). Alternatively, a compound that has already undergone step (i) may be attached to the minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity.

Any preferred compounds can be used as compounds with cell-binding activity, so long as they are capable of binding to a cell surface, and thereby assisting a composition of this invention to introduce a pharmaceutical or gene into cells. For example, compounds binding to cell surface proteins or cell

surface sugar chains can be used as such compounds. Specific examples are viral envelope proteins, natural or synthetic ligands, hormones, or cell adhesion factors. Specifically, folic acid, transferrin, erythropoietin, antibody, lectin, galactose, mannose, and such can be used.

Among them, in this invention, folic acid was proved to be extremely effective in maintaining the pharmaceutical- or gene-introducing ability of the complex comprised in the compositions of this invention. The present invention provides pharmaceutical- or gene-carrier compositions which comprise a cell membrane comprising a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, wherein (a) a compound is attached to the protein; (b) hemagglutinating activity is reduced compared to a composition to which the compound is not attached; (c) the composition comprises a complex formed by the protein and folic acid; and (d) the composition has the ability to introduce a pharmaceutical or gene into target cells. In particular, folic acid preferably binds directly to the compound attached to the protein.

When producing the compositions of this invention using a compound with cell-binding activity, a particularly preferable compound to be attached to the envelope protein with hemagglutinating activity is an antibody that binds to the protein. In a preferred embodiment the compositions of this invention are compositions comprising an envelope protein with hemagglutinating activity bound with an antibody or fragments thereof, wherein the envelope protein forms a complex with the compound with cell-binding activity. That is, the present invention relates to pharmaceutical- or gene-carrier compositions which comprise a cell membrane comprising a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, wherein (a) an antibody or fragment thereof that binds to the protein is bound to the protein; (b) hemagglutinating activity is reduced compared to a composition to which the compound is not attached; (c) the composition comprises a complex formed by the protein and the compound with cell-binding activity; and (d)

the composition has the ability to introduce a pharmaceutical or gene into target cells. The compound with cell-binding activity is more preferably bound directly to the antibody or fragments thereof.

5 In this invention, antibodies include monoclonal antibodies and polyclonal antibodies. They further include antisera obtained by immunizing experimental animals such as rabbits with the proteins of this invention, all classes of polyclonal antibodies and monoclonal antibodies, and further, human  
10 antibodies, and humanized antibodies that result from gene recombinations. Polyclonal antibodies are produced by, for example, preparing an envelope protein having hemagglutinating activity, or partial peptides thereof; and immunizing a rabbit, goat, sheep, or such with this protein or peptide as an antigen.  
15 As an antigen peptide, the extracellular domain of the envelope protein with hemagglutinating activity, or fragments thereof, can be used. Antigen peptides can be appropriately coupled to other proteins, for example, carrier proteins such as keyhole limpet hemocyanin and albumin for immunization. Monoclonal  
20 antibodies can be prepared by using the spleen cells of immunized mice or rats to obtain hybridomas that produce monoclonal antibodies. Antibodies can be prepared by methods known in the art (Harlow, E. and Lane, D. (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988;  
25 Shepherd, P. and Dean, C. (eds.), *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (Practical Approach Series, 227), Oxford Univ Press, 1999). Polyclonal antibodies can be purified from sera, while monoclonal antibodies can be purified from hybridoma culture supernatants or ascites of animals inoculated with  
30 hybridomas, using common biochemical techniques such as ammonium sulfate fractionation, protein G Sepharose column, affinity columns with an immobilized antigen, etc. In this invention, an antibody that binds to an exterior region (an extracellular domain) of an envelope protein with hemagglutinating activity,  
35 is preferably a monoclonal antibody, and more preferably an HN-1 described in Example 12, can be used (Miura et al., *Exp. Cell*

Res., 1982, 141, 409-420). The antibodies in this invention may be antibody fragments, so long as they bind to the envelope proteins with hemagglutinating activity (antigen proteins), and comprise, for example, a Fab, Fab(t), Fab', F(ab')<sub>2</sub>, antibody  
5 variable region fragment (Fv), single chain Fv (scFv), or modified derivative thereof. Fab is a complex consisting of one polypeptide chain comprising an antibody H chain variable region and one polypeptide chain comprising an L chain variable region. These polypeptides bind with each other to form one antigen-  
10 binding site (monovalent). Although Fab is typically obtained by digesting immunoglobulins with papain, in this invention, fragments comprising a structure equivalent thereto are also referred to as Fab. Specifically, Fab includes a dimeric protein in which immunoglobulin L chain and polypeptide chains  
15 comprising an H chain variable region (V<sub>h</sub>) and C<sub>H</sub>1 are linked. Fab' (obtained by digesting immunoglobulin with pepsin followed by cleaving the disulfide bond between H chains), Fab(t) (obtained by digesting immunoglobulin with trypsin), and such also have structures equivalent to that of Fab. Furthermore,  
20 F(ab')<sub>2</sub> means an antibody whose constant region is deleted, or a protein complex comprising a structure equivalent thereto, and specifically refers to a protein complex of two complexes, consisting of one polypeptide chain comprising an antibody H chain variable region and one polypeptide chain comprising an L  
25 chain variable region. F(ab')<sub>2</sub> is a divalent antibody comprising two antigen-binding sites. F(ab')<sub>2</sub> is typically obtained by digesting an antibody with pepsin at around pH 4, and comprises the H chain hinge region. However, F(ab')<sub>2</sub> may be digested with other proteases, or cleaved with pharmaceuticals,  
30 or artificially designed. scFv stands for a polypeptide in which an antibody H chain variable region and L chain variable region are comprised in a single polypeptide chain. An H chain variable region and an L chain variable region are joined via a spacer of appropriate length, binding with each other to form an  
35 antigen-binding site. Such antibody fragments can be prepared from, for example, descriptions in "New Biochemistry Experiments

(Shin Seikagaku Jikken Kouza) 12, Japanese Society of Biochemistry, ed. Molecular Immunology III pp 185-195 (Tokyo Kagaku Dojin)" and/or "Current Protocols in Immunology, Volume 1, (John Wiley & Sons, Inc.)". Antibody fragments can be obtained  
5 by digesting antibodies with proteolytic enzymes such as pepsin, papain, or trypsin. Alternatively, antibody fragments can be prepared by identifying the amino acid sequences of the variable regions, and expressing these sequences as recombinant proteins. Furthermore, antibodies also include humanized antibodies or  
10 human antibodies. Antibodies can be purified by affinity chromatography using a protein A column, protein G column, and such.

In this invention, it is particularly preferable to attach fragments comprising an antibody variable region (antigen-  
15 binding region) to the envelope protein with hemagglutinating activity. Any preferred fragments that comprise variable regions of H chain and/or L chain of antibody can be used as such fragments, including, for example, Fab, Fab(t), Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, or modified derivatives thereof.

20 In this invention, the pharmaceuticals to be transferred into cells may be any preferred compounds, such as naturally occurring compounds, synthetic compounds, inorganic or organic compounds, and small or macromolecular compounds. Furthermore, the genes to be delivered by a composition of this invention may  
25 be any preferred nucleic acids, exemplified by nucleic acids such as DNA or RNA, and derivatives thereof. Nucleic acids may be cyclic and linear single- or double-stranded deoxyribonucleic or ribonucleic acids. Examples of nucleic acid derivatives are the phosphothioate and phosphodithioate. Specific examples of  
30 pharmaceuticals or genes to be delivered by the compositions of this invention are: antisense nucleic acids (Drug Delivery System, 10, 91-97, 1995); decoy (Journal of Biological Chemistry, 267, 12403-12406, 1994); ribozymes (Drug Delivery System, 10, 91-97, 1995); triple-stranded DNAs (Saibokogaku, vol. 13, No. 4, 277-285, 1994); plasmid DNAs (Methods Enzymology, 221, 317-327, 1993); RNA vectors; and complexes of these substances and  
35

carriers (Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, 89, 7934-7938, 1992) or proteins (Journal of Biological Chemistry, 266 (6), 3361-3364, 1991); and anticancer drugs, antiviral drugs, toxins (diphtheria toxin (Biochim Biophys Acta, 1192, 253-262, 1994); lysine (Biochim Biophys Acta, 1070, 246-252, 1991)), enzymes (Immunology, 81, 280-284, 1994), and other preferred biologically active substances. A preferred gene can also be inserted into a genomic nucleic acid and expressed from a recombinant virus.

The compositions of this invention can be used in direct administration (*in vivo*) and indirect administration (*ex vivo*) to the living body, and furthermore, can be administered into cells outside the living body (*in vitro*). In *in vivo* application, the composition may be administered through any preferred administration route, as long as the pharmaceutical or gene can reach a target cell or tissue. Depending on the properties of the active ingredients, administration can be performed, for example, orally, percutaneously, intranasally, perbronchially, intramuscularly, intraperitoneally, intravenously, intraarticularly, or subcutaneously, but is not limited to these routes. Furthermore, the compositions can be administered systemically or locally. In *in vitro* (including *ex vivo*) administrations, the compositions of this invention are attached so as to contact target cells, for example, they are attached into cell cultures. Since the compositions of this invention are extremely stable in blood in particular, they are useful as injections that are used for administration into the blood, such as for intravenous injections.

Complexes comprising a cell membrane comprising a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, prepared by a method of this invention, can be combined with a preferable and pharmacologically acceptable carrier or vehicle, as necessary. "Pharmacologically acceptable carriers or vehicles" are materials that can be administered together with the complex, and do not significantly inhibit the introduction of a pharmaceutical or gene into cells via this complex.

Compounds can be formulated by appropriately combining, for example, sterilized water, physiological saline, culture medium solution, serum, and phosphate-buffered saline (PBS). When a minus-strand RNA vector is proliferated in hen eggs, the composition may contain allantoic fluids. Furthermore, the compositions of this invention may comprise carriers or vehicles such as deionized water and 5% dextrose aqueous solution; stabilizers for liposome membranes (e.g. sterols such as cholesterol); antioxidants (such as tocopherol and vitamin E); and additionally, plant oils, suspension agents, surfactants, stabilizers, biocides, and such.

Furthermore, preservatives and other additives can be attached thereto. The compositions of this invention may be in any form, such as an aqueous solution, capsule, suspension, or syrup, and also in the form of a solution, freeze-dried preparation, or aerosol. In the case of freeze-dried preparations, the compositions of this invention may comprise, as a stabilizer, sorbitol, sucrose, amino acid, various proteins, etc. Compositions comprising a minus-strand RNA viral vector are useful as reagents and pharmaceuticals.

Those skilled in the art can appropriately determine the dose of the compositions of this invention, which varies depending upon the disorder, patient body weight, age, gender, and symptoms, the purpose of administration, dosage form of composition, administration method, type of pharmaceutical or gene to be introduced, and such. When the composition comprises an infective minus-strand RNA virus, it is preferably administered with a pharmaceutically acceptable carrier, preferably in a dose in the range of about  $10^5$  CIU/ml to about  $10^{11}$  CIU/ml, more preferably about  $10^7$  CIU/ml to about  $10^9$  CIU/ml, and most preferably about  $1 \times 10^8$  CIU/ml to about  $5 \times 10^8$  CIU/ml. In humans, a single dose is preferably in the range of  $2 \times 10^9$  CIU to  $2 \times 10^{10}$  CIU, and administration may be carried out once or a number of times within a clinically acceptable range of side effects. The same can be said of the number of daily administrations. For non-human animals, an amount can be



administered that is calculated from the above-described doses, based on the body weight ratio or volume ratio of target site of administration (e.g. average values) between a target animal and a human.

5       The animals to be administered the compositions of this invention are not particularly limited, and are, for example, birds, mammals, and other vertebrates, such as chickens, quails, mice, rats, dogs, pigs, cats, bovine, rabbits, sheep, goats, monkeys, and humans. When the methods of this invention are  
10 used *in vitro* (including *ex vivo*), for example, humans, non-human mammals, and birds can be used. When the methods of this invention are used *in vivo*, non-human mammals and birds are used in particular.

      Furthermore, the present invention relates to an antibody,  
15 or fragments thereof, that bind to a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, wherein a compound binding to the cell is coupled to the antibody or fragments thereof. Such an antibody, or fragments thereof, bind to the envelope protein via attachment to a minus-strand RNA  
20 virus or processed products thereof, and thus reduces hemagglutinating activity, while a cell-binding compound maintains the function of assisting in viral adhesion to the cell. Therefore, such an antibody or fragments thereof are extremely useful in producing the pharmaceutical- or gene-  
25 carrier compositions of this invention. The antibody or fragments thereof may be any preferred fragments comprising variable regions of an L chain and/or H chain of an antibody as described above. More specifically they are preferably Fab, Fab(t), Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, and such. Among them, F(ab')<sub>2</sub>  
30 is preferably used, in particular. As the cell-binding compounds, ligands of cell surface receptors are particularly preferred, such as folic acid transferrin, erythropoietin, antibody, lectin, galactose, mannose, etc.

      The antibodies of this invention, or fragments thereof, can  
35 be formed into a composition together with pharmaceutically acceptable carriers. Such carriers comprise, for example, water,

alcohol, glycerol, salts, proteins, and gelatin, and pH buffering agents, stabilizers, suspending agents, and preservatives known in the art.

Furthermore, this invention relates to kits which comprise:

- 5 (a) an antibody or fragments thereof binding to a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, wherein a compound is bound to the antibody or fragments thereof; and (b) a pharmaceutical- or gene-carrier composition which comprises a cell membrane comprising the envelope protein.
- 10 Examples of a pharmaceutical- or gene-carrier composition comprising a cell membrane that comprises the envelope proteins include infective virions, inactivated viruses, or liposomes comprising a viral envelope. Infective virions may be, for example, minus-strand RNA viruses or other viruses comprising an
- 15 envelope protein with hemagglutinating activity of the minus-strand RNA virus. A pharmaceutical- or gene-carrier composition with reduced hemagglutinating activity can be prepared by adding an above-described antibody or fragments thereof, to these viruses, and thereby binding the antibody or fragments thereof
- 20 to the envelope protein. For example, hemagglutinating activity can be appropriately controlled, according to the purpose, to enhance stability in blood or such for *in vivo* administration. These compositions can be easily prepared by mixing kit components prior to use, thus producing a very easy to use
- 25 delivery system.

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a diagram showing PEG-modification of the envelope proteins (HN and F proteins) of SeV vector, using TPEG- and SPA-PEG modification reagents.

Fig. 2 is a graph of the results of measuring SeV vector and TPEG-modified SeV vector hemolytic activity toward rat blood, at 37°C for 15 minutes.

Fig. 3 is a bar graph showing the results of examining SeV vector and TPEG-modified SeV vector stability in rat blood. After treatment at 37°C for one, 15, and 30 minutes, the plasma

was separated and HeLa cells were infected. After 24 hours, the expression level of *LacZ* gene was quantified. The results are shown as the mean value of three determinations  $\pm$  the standard deviation.

5 Fig. 4 is a photograph showing the SeV vector and TPEG-modified SeV vector subjected to SDS electrophoresis and then silver staining. Arrows indicate the electrophoretic positions of HN protein and F protein. Lane 0 corresponds to the SeV vector, while lanes 8 to 10 correspond to sample numbers 8 to 10  
10 in Table 2, respectively.

Fig. 5 is a series of photographs showing the results of using X-gal staining method to assess *LacZ* expression levels after introducing the SeV vector and SPA-PEG5K-modified SeV vector into LLCMK2 cells, in the presence of rabbit anti-SeV  
15 antiserum (10-, 100-, and 1,000-fold diluted sera).

Fig. 6 is a diagram illustrating the selective modification of HN protein comprised in the SeV vector with a folic acid-bound anti-HN monoclonal antibody.

Fig. 7 is a graphic representation of the HAU of SeV  
20 vectors modified with HN-1, HN-1/F(ab')<sub>2</sub>, or the folic acid-bound antibodies thereof, prepared by NHS method. The y-axis represents antibody concentration, and the x-axis represents the logarithm of hemagglutinating activity ( $\log_2(\text{HAU})$ ).

Fig. 8 is a bar graph representing the hemolytic activity  
25 of SeV vector, HN-1-modified SeV vector, and folic acid-bound HN-1-modified SeV vector toward chicken erythrocytes. The results shown were obtained for SeV vector at  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ , and  $1 \times 10^9$  pfu/ml. Modified vectors are  $1 \times 10^9$  pfu/ml of each SeV vector modified with 100  $\mu\text{g/ml}$  of antibody. The x-axis in the  
30 figure is the absorbance at 570 nm, showing the amount of released hemoglobin measured.

Fig. 9 is a bar graph representing *LacZ* gene expression two days after infecting KB cells with SeV vector, HN-1-modified SeV vector, and folic acid-bound HN-1-modified SeV vector. In the  
35 infection experiments, conditions of excessive folic acid were created by adding 1 mM folic acid into the culture medium. The

results are shown as the mean value of three determinations  $\pm$  the standard deviation.

Fig. 10 is a bar graph showing *LacZ* gene expression two days after infecting KB cells with SeV vectors modified with HN-1, HN-1/F(ab')<sub>2</sub> or their folic acid-bound derivatives. The results are shown as the mean value of three determinations  $\pm$  standard deviation.

Fig. 11 is a graphic representation of changes in HAU for SeV vectors modified with HN-1 or folic acid-bound HN-1, prepared by the EDC method, in the presence of various amounts of antibodies. The y-axis represents antibody concentration, and the x-axis represents the logarithm of erythrocyte agglutination activity ( $\log_2(\text{HAU})$ ).

Fig. 12 is a graphic representation of changes in the PEG-modified SeV titer. SeV was modified with varying amounts of PEG, and the relative infection efficiency (%) of modified SeV vectors was examined.

Fig. 13 is a graphic representation of changes in the HA activity of PEG-modified SeV. SeV was modified with varying amounts of PEG, and the HA activity of modified SeV vectors was examined.

Fig. 14 is a bar graph showing the correlation between the infectivity and HA activity of PEG-modified SeV, indicating that PEG-modification can increase infectivity relative to HA activity.

Fig. 15 is a series of photographs showing the results of analyzing constituent proteins of PEG-modified SeV using silver staining. Bands derived from envelope F and HN proteins decreased as the reacting PEG amount was increased, and alternative bands appeared in macromolecular fractions.

Fig. 16 is a series of photographs showing the results of analyzing constituent proteins of PEG-modified SeV by Western blotting.

Fig. 17 represents a series of bar graphs and photographs showing the resistance of PEG-modified SeV against neutralizing antibody. Resistance was compared under conditions where the

total virion number (total protein amount) of modified SeV was fixed.

Fig. 18 illustrates an *in vivo* assessment of PEG10K-modified SeV, showing the administration schedule and administration conditions of modified SeV, and changes in the anti-SeV antibody titer.

Fig. 19 is a series of photographs representing an *in vivo* assessment of PEG10K-modified SeV, showing expression of the introduced gene in a lung, for the *in vivo* administration of the modified SeV of Fig. 18.

Fig. 20 is a series of bar graphs showing the holding effect of PEG-modified SeV infectivity under 4°C storage conditions.

Fig. 21 is a bar graph showing the modification effect of polyethyleneimine (PEI750K). PEI increased the infectivity of PEG-modified SeV.

#### Best Mode for Carrying Out the Invention

Hereinafter, the present invention will be specifically described using Examples, but is not to be construed as being limited thereto. References cited herein are all incorporated as a part thereof.

[Example 1] Preparation and purification of SeV vector comprising NLS-*LacZ* gene

NLS-*LacZ*/SeV carrying *LacZ* gene with a nuclear localization signal (NLS-*LacZ*) was prepared by a previously published method (Kato et al., *Genes Cells*, 1996, 1, 569-579; Hasan et al., *J. Gen. Virol.*, 1997, 78, 2813-2820). This vector was inoculated to 10-day-old embryonated hen eggs. After incubation at 35.3°C for three days, allantoic fluids were harvested, and centrifuged at 4,000 rpm for 15 minutes. The obtained supernatant was then centrifuged at 10,000 rpm for one hour to precipitate the vector. After resuspension in PBS, the vector was layered on a sucrose density gradient (30%/50%), and centrifuged at 25,000 rpm for one hour (in a Beckman rotor SW28). The vector at the sucrose

interface was harvested, centrifuged, precipitated, and then resuspended in PBS to prepare a stock solution of purified vector (hereinafter, described as SeV vector). The protein concentration of the vector was measured by a BCA protein assay (Pierce), using the vector solubilized with an equal volume of 2% SDS solution as a sample, and using BSA as the standard. Hemagglutination units (HAU) were determined as described below. In a 96-well round bottom plate (Asahi Technoglass), the vector was serially diluted two-fold with PBS (50  $\mu$ l per well). 50  $\mu$ l of 1% chicken erythrocytes solution washed with PBS was added to each well, incubated at 4°C for one hour, and then assessed. HAU was expressed as the maximum vector dilution ratio that caused hemagglutination. Furthermore, plaque forming units (pfu) were calculated using the following formula: 1 HAU of SeV = about  $10^6$  pfu/ml. For purified vector, the formula was as follows: 1 mg of protein/ml = 4,096 to 5,120 HAU/ml = about  $5 \times 10^9$  pfu/ml.

[Example 2] Preparation of TPEG-modified SeV vector

The SeV vector stock solution in Example 1 was diluted to 2 mg protein per ml in PBS. 0.5 ml of 0.5 M borate buffer (pH8.5) was added to 0.5 ml of this solution to prepare a 1 mg protein/ml solution of pH8.5. 1 mg of Tresyl-activated PEG reagent (TPEG, MW: 5,000) (Shearwater Polymers) was added to the above-described solution in small amounts while stirring, and reacted at room temperature for 90 minutes (Fig. 1). After the reaction was completed, the reaction mixture was diluted with ice-cold PBS (14 ml), and the vector was recovered by centrifuging at 15,000 rpm for one hour (in a Beckman rotor SW28.1). The vector was resuspended in PBS (0.8 ml), and the TPEG-modified SeV vector was obtained. Protein concentration and HAU of the modified vector were determined as in Example 1.

[Example 3] *In vitro* gene expression using TPEG-modified SeV vector

The SeV vector stock solution in Example 1 was diluted to  $1 \times 10^5$  pfu/ml in PBS. The protein concentrations of the TPEG-modified SeV vector solution in Example 2 and the unmodified SeV vector solution were normalized, thus rendering an equal number of virions for both vectors. The day before the experiment, HeLa cells (derived from human cervical carcinoma) were plated on a 12-well plate (Sumitomo Bakelite) at  $5 \times 10^4$  cells/well (in 1 ml/well of MEM medium supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS)). The medium was reduced to 0.5 ml, 50  $\mu$ l of the above-described diluted vector solutions were added to each well (equivalent to  $5 \times 10^3$  pfu/well when converted into SeV vector, moi= 0.1), and infection was carried out at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. After one hour, the vector was removed and the cells were washed twice with medium. Fresh medium (2 ml) was added to the cells, which were then further incubated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. *LacZ* gene expression was measured using the Galacto-Light Plus™ (Tropix) protocol, and cellular proteins were measured using the BCA method (Pierce). The results were expressed in light units (RLU/ $\mu$ g protein).

Table 1 shows the HAU of TPEG-SeV vector and gene expression level by the vector. For the same protein concentration, that is, for the same number of virions, the HAU of TPEG-SeV vector was 1/2,000 or less of that of SeV vector. At the same time, for the same number of virions, TPEG-SeV vector retained approximately 50% of the gene expression level in HeLa cells. Thus, it has now become possible to prepare a vector in which only HAU is remarkably reduced, without seriously damaging its ability to introduce a gene into cells.

Table 1

	Protein Concentration (mg/ml)	HAU/mg	<i>LacZ</i> Expression Level (RLU/ $\mu$ g cell protein)
SeV Vector	0.93	5120	2335604 $\pm$ 72774
TPEG-Modified	0.99	2	1046353 $\pm$ 29841

---

SeV Vector

---

## [Example 4] Hemolytic activity assay

Fresh blood, collected from the carotid artery of SD strain rats under ether anesthesia using a heparinized syringe, was used in experiments. The SeV vector of Example 1 and the TPEG-modified SeV vector of Example 2 were diluted in PBS to prepare a series of solutions comprising 1 to 1000 µg protein per ml. A diluted solution of vector (50 µl) and rat blood (50 µl) were mixed and incubated for 15 minutes at 37°C. After cooling on ice at 4°C, plasma was separated by centrifugation. The amount of hemoglobin released into the plasma was measured using absorbance at 570 nm (OD570). OD570 when PBS was used in place of the vector solution was used as the negative control. The OD570 of distilled water was used as the positive control (100% hemolysis). The hemolytic activity of the vector was calculated using the following formula:

$$\text{Hemolytic activity (\%)} = \frac{[(\text{OD570 of the vector solution}) - (\text{OD570 with PBS})]}{[(\text{OD570 of distilled water}) - (\text{OD570 with PBS})]} \times 100.$$

As shown in Fig. 2, SeV vector showed strong concentration-dependent hemolytic activity. On the other hand, the hemolytic activity of TPEG-modified SeV vector was found to be extremely low. 1000 µg of TPEG-modified SeV vector had a hemolytic activity equivalent to that of 5 µg of SeV vector, indicating an approximately 200-fold improvement of vector safety by TPEG-modification.

## [Example 5] Stability test in rat blood

The SeV vector of Example 1 was diluted with PBS to  $1 \times 10^8$  pfu/ml. The TPEG-modified SeV vector of Example 2 was diluted with PBS so that the viral protein concentration was equal to that of the SeV vector. 250 µl of diluted vector solution and 250 µl of fresh SD rat blood (male) were mixed, and incubated at 37°C. After a predetermined time, an 80 µl blood sample was collected, and plasma was recovered by centrifuging at 4°C.



Using 50  $\mu$ l of a solution prepared by diluting 10  $\mu$ l of plasma 50-fold in PBS, *LacZ* gene expression in HeLa cells was examined by the method set forth in Example 3.

As shown in Fig. 3, SeV vector was significantly  
 5 destabilized immediately after blood treatment, and the 15-minute blood treatment decreased its gene expression ability to 1/1000 of the untreated SeV vector. On the other hand, the stability of TPEG-modified SeV vector in blood was improved, indicating remarkably high gene expression ability compared to the  
 10 unmodified vector.

[Example 6] Preparation of SPA-PEG2K-modified SeV vector

The SeV vector stock solution in Example 1 was diluted with PBS to adjust the concentration to 2 mg protein/ml. This  
 15 solution was diluted two-fold with 0.5 M borate buffer (pH8.5) to prepare a 1 mg/ml protein solution. Succinimidyl propionic acid derivative PEG reagent (molecular weight 2000) (SPA-PEG2K, Shearwater Polymers) (1, 2, or 4 mg) was added to the above-described solution in small amounts while stirring, and this was  
 20 reacted at room temperature for 30 minutes (Fig. 1). After completing the reaction, the reaction solution was diluted with 14 ml of ice-cold PBS, and centrifuged at 13,000 rpm for one hour (in a Beckman rotor SW28.1). The vector was collected and then resuspended in 0.8 ml of PBS to obtain the SPA-PEG2K-  
 25 modified SeV vector (Table 2, sample Nos. 1 to 3). Protein concentration of the modified vector was determined as for Example 1.

Table 2

Sample Name	Sample No.	Reaction Amount of PEG (mg)	HAU/mg Protein	<i>LacZ</i> Gene Expression ratio (%)
SeV Vector (Example 1)		-	4096	100.0 $\pm$ 7.5
SPA-PEG2K	1	1	1024	29.1 $\pm$ 2.6
Modified	2	2	512	4.7 $\pm$ 0.2

(Example 6)	3	4	<1	$0.5 \pm 0.01$
SPA-PEG5K	4	1	2048	$115.4 \pm 14.2$
Modified	5	2.5	2048	$93.1 \pm 4.2$
(Example 7)	6	5	512	$42.7 \pm 4.9$
	7	10	<1	$1.6 \pm 0.1$
SPA-PEG20K	8	10	1024	$95.3 \pm 9.7$
Modified	9	20	4	$48.3 \pm 1.5$
(Example 8)	10	40	<1	$0.2 \pm 0.02$

[Example 7] Preparation of SPA-PEG5K-modified SeV vector

SPA-PEG2K in Example 6 was replaced with SPA-PEG5K (MW: 5000) (Shearwater Polymers). The reaction and purification were similarly performed with reaction amounts of 1, 2.5, 5, or 10 mg PEG to obtain SPA-PEG5K-modified SeV (Table 2, sample Nos. 4 to 7).

[Example 8] Preparation of SPA-PEG20K-modified SeV vector

SPA-PEG2K in Example 6 was replaced with SPA-PEG20K (MW: 20,000) (Shearwater Polymers). The reaction and purification were similarly performed with reaction amounts of 10, 20, or 40 mg PEG to obtain SPA-PEG20K-modified SeV (Table 2, sample Nos. 8 to 10).

Fig. 4 shows the results of subjecting SPA-PEG20K-modified SeV vector to SDS-electrophoresis, and then silver staining to stain each constituent protein. As the amount of PEG in reaction increased, the bands derived from HN protein decreased, and instead, bands appeared in higher molecular weight fractions. These bands were thought to be derived from the polymerized PEG-bound HN protein. On the other hand, a small decrease in F protein band was observed. These results showed that, of the two proteins HN and F, the HN protein was mainly modified in the PEG-modification of the SeV envelope.

[Example 9] HAU of SPA-PEG-modified SeV vector and *in vitro* gene expression by the vector

HAUs of SeV vector in Example 1 and PEG-modified SeV vectors in Examples 6, 7, and 8 (sample Nos. 1 to 10) were measured using the method described in Example 1. Furthermore, *LacZ* gene expression in HeLa cells was measured using the method described in Example 3, except that the MOI was changed to 0.5, and the number of days of incubation was changed to two days.

Table 2 shows HAU and the results of *LacZ* expression. As the reaction amount of PEG increased, the HAU of the obtained modified SeV vectors decreased. Although *LacZ* gene expression by PEG-modified SeV vectors decreased compared to that of the SeV vector, by limiting the reaction amount of PEG as shown in Table 2, HAU could be greatly reduced while holding down the decrease in gene expression ability. Thus, by selecting modification conditions, modified vectors with sufficient gene expression ability were found to be obtainable.

[Example 10] *In vitro* gene expression by SPA-PEG-modified SeV vector in the presence of erythrocytes

HeLa cells were prepared as in Example 3. The medium was removed just prior to the experiment, and 300  $\mu$ l of PBS-washed chicken erythrocytes, adjusted to  $1 \times 10^9$  cells/ml, were added instead. In the control group, PBS was used in place of the erythrocyte solution. 50  $\mu$ l of each of the SeV vector of Example 1 or the PEG-modified SeV vectors of Table 2 (sample Nos. 1, 2, 4, 5, 6, 8, and 9) were added to the wells to infect the cells at 37°C for a short period of 5 minutes. The amounts of vector added were adjusted based on Table 2, so as to make the expression efficiency the same. As for to Example 3, cells were treated to measure *LacZ* gene expression levels 48 hours later.

Table 3 shows the gene expression levels of each sample in the presence of erythrocytes. The results were expressed as relative ratios, taking the expression level in the absence of erythrocytes as 100. For the SeV vector, the presence of erythrocytes reduced the level of gene expression to about 20%

of that of the control. On the other hand, in PEG-modified samples, a decrease in HAU was accompanied by a reduced interaction of the vector with erythrocytes, indicating a high level of gene introduction efficiency even in the presence of erythrocytes. These results indicate that in a clinical setting, PEG-modified SeV vectors may allow a quick gene introduction mediated by blood.

Table 3

Sample Name	Sample No.	LacZ Gene Expression Ratio in the Presence of Erythrocytes (%)
SeV Vector (Example 1)		22.5 ± 4.2
SPA-PEG2K Modified (Example 6)	1	47.6 ± 2.0
	2	49.2 ± 13.8
SPA-PEG5K Modified (Example 7)	4	34.4 ± 3.4
	5	46.7 ± 4.0
	6	53.9 ± 4.8
SPA-PEG20K Modified (Example 8)	8	46.1 ± 9.7
	9	49.6 ± 6.1

[Example 11] Gene introduction by SPA-PEG5K-modified SeV vector in the presence of neutralizing antibody

(1) Preparation of SPA-PEG5K-modified SeV vector

NLS-LacZ/SeV vector was prepared and purified as in Example 1, and a stock solution thereof was prepared. This vector was reacted with 5 mg of SPA-PEG5K, using the method set forth in Example 7, and the SPA-PEG5K-modified SeV vector was prepared. Titters of this vector against LLCMK2 cells were determined as described below. On the day before the experiment, LLCMK2 cells were plated onto a 6-well plate (Sumitomo Bakelite) at  $1 \times 10^6$  cells/well (in 2ml/well of 10% FCS-supplemented MEM medium).

The vector was diluted to a concentration of 1 mg protein/ml in PBS containing 1% FCS, and a 10-fold serial dilution series was further prepared. After removing the medium of the above-described cells, 1 ml of the diluted vector solutions was added to each well, and infection was carried out for one hour at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. After removing the vector solution, the cells were washed with medium, and 2 ml/well of fresh medium was added. This was further incubated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was removed two days later. After washing with PBS, cells expressing *LacZ* gene were X-gal stained using a  $\beta$ -Gal staining kit (Invitrogen). The number of infected cells in the visual field of a 200x magnification was counted for any ten random spots in a well. Based on mean cell counts and area of the visual field, the titer in the well as a whole was calculated using the following formula:

$$\text{LacZ infection titer (CIU/ml)} = (\text{number of infected cells}) \times 854.865 \times (\text{dilution ratio})$$

As a result, titers of SeV vector and SPA-PEG5K-modified SeV vector were  $1.4 \times 10^{10}$  CIU/ml and  $2.7 \times 10^9$  CIU/ml, respectively.

## (2) Gene introduction in the presence of neutralizing antibody

The SeV vector and SPA-PEG5K-modified SeV vector of Example 11-(1) were diluted with PBS to adjust the titer to  $1 \times 10^7$  CIU/ml. 10-, 100-, and 1000-fold diluted solutions of anti-SeV antiserum prepared by immunizing rabbits with SeV (treated at 56°C for one hour) or PBS (30  $\mu$ l each) were added to 30  $\mu$ l of the vector solution, and incubated at room temperature for one hour. On the day before experiment, LLCMK2 cells were plated onto a 12-well plate (Sumitomo Bakelite) at  $2 \times 10^5$  cells/well (in 1 ml/well of MEM medium supplemented with 10% FCS). The medium was reduced to 0.5 ml, and 40  $\mu$ l of the above-described antiserum-treated vector solution was added to each well, to infect cells at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for one hour. Then, two days later *LacZ* gene expression was assessed by X-gal staining, as for Example 11-(1).

As shown in Fig. 5, the gene introduction efficiency of SeV vector was remarkably reduced in the presence of the antiserum. On the other hand, SPA-PEG5K-modified SeV vector could retain sufficient gene introduction ability, even in the presence of the antiserum.

[Example 12] Preparation and purification of anti-HN monoclonal antibody, HN-1

Hybridoma cells that produce the anti-HN monoclonal antibody, HN-1 (Miura et al., Exp. Cell Res., 1982, 141, 409-420), were successively passaged in Hybridoma-SFM medium (Gibco-BRL) at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>, and 1000 ml of a cell suspension comprising  $2 \times 10^5$  cells/ml was prepared. The culture was further continued for two weeks, and then the supernatant was obtained by centrifugation at 3,000 rpm for 10 minutes. This supernatant was then filtered through a 0.45  $\mu$ m filter. The monoclonal antibody was purified using Protein G column chromatography. The culture supernatant was passed through a 5-ml Protein G column (Pharmacia), equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH7.0), using a peristaltic pump (a P-1 pump: Pharmacia) at a flow rate of 4.2 ml/min, and the antibody was bound to the column. After washing the column with 20 mM sodium phosphate buffer (pH7.0), the antibodies were eluted with 0.1 M glycine-HCl buffer solution (pH2.7). The eluate was neutralized with 1 M Tris-HCl buffer solution (pH9.0), and then concentrated by ultrafiltration (Centriplus-20, molecular weight cutoff 30,000: Amicon). After exchanging the buffer with PBS using a PD-10 desalting column (Pharmacia), which was equilibrated with PBS, the solution was once more condensed by ultrafiltration, and 160  $\mu$ l of HN-1 PBS solution was obtained. The protein concentration, as determined by BCA protein assay (Pierce) using bovine  $\gamma$ -globulin as a standard, was 37.6 mg/ml.

[Example 13] F(ab')<sub>2</sub> fragmentation of the anti-HN monoclonal antibody, HN-1

The purified monoclonal antibody HN-1 of Example 12 was diluted with 0.2 M acetate buffer (pH4.5) to adjust the concentration to 2 mg protein/ml. 2.35 ml of Pepsin solution (Sigma) adjusted to 0.1 mg/ml in 0.2 M acetate buffer (pH4.5) was added to 2.35 ml of the protein solution, and then reacted at 37°C for 21 hours. After neutralizing the reaction mixture with 700 µl of 1 N sodium hydroxide solution, PBS was added to the solution to adjust the total volume to 25 ml. This solution was loaded onto a 1-ml Protein A column (Pharmacia), equilibrated with PBS, and unreacted antibody was absorbed to the column. Fractions that passed through the column were recovered and condensed by ultrafiltration as in Example 12. The condensed solution was further purified by the gel filtration method using a Sephadex 75 column (Pharmacia) equilibrated with PBS. The purified solution was condensed by ultrafiltration to recover a PBS solution (300 µl) of the F(ab')<sub>2</sub> fragment of HN-1 (hereinafter abbreviated as HN-1/F(ab')<sub>2</sub>). Protein concentration was measured as for Example 12, and the obtained HN-1/F(ab')<sub>2</sub> was determined to be 4.08 mg/ml.

20

[Example 14] Preparation of folic acid-bound monoclonal antibody by NHS method

(1) Synthesis of NHS-activated folic acid

Synthesis was performed by the method of Robert et al. (Journal of Biological Chemistry: Feb. 4, 269 (5), 3198-3204, 1994). Specifically, folic acid (Sigma) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to prepare a 50 mg/ml solution. 250 µl of triethylamine (Pierce), 470 mg of dicyclohexylcarbodiimide (Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.), and 260 mg of N-hydroxysuccinimide (NHS) (Sigma) were added in sequence to this solution. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature in the dark. The precipitated side products were removed by filtration, and the filtrate was added in drops to 250ml of diethylether while stirring. The yellow precipitate was repeatedly washed with ether, and then dried under reduced pressure to obtain NHS-activated folic acid.

(2) Preparation of folic acid-bound HN-1

100  $\mu$ l of a PBS solution containing 2.0 mg/ml of the HN-1 solution purified by the method of Example 12, and 100  $\mu$ l of 0.5 M borate buffer (pH8.0), were mixed and used as a reaction solution. 2.5  $\mu$ l of the DMSO solution of Example 14-(1) containing NHS-activated folic acid (5 mg or 10 mg/ml) was added drop-wise to the reaction solution. This was then reacted at room temperature in the dark for one hour. The unreacted folic acid was removed using a PD-10 column equilibrated with PBS. The protein fraction was recovered, condensed by ultrafiltration to obtain the folic acid-bound HN-1, and then protein concentration was measured according to Example 12.

(3) Preparation of folic acid-bound HN-1/F(ab')<sub>2</sub>

HN-1 was replaced with an HN-1/F(ab')<sub>2</sub> solution, and the concentration of NHS-activated folic acid was changed to 10 mg/ml, and then the reaction and purification were carried out as for Example 14-(2), to obtain folic acid-bound HN-1/F(ab')<sub>2</sub>.

[Example 15] HA activity of folic acid-bound monoclonal antibody-modified SeV vector

The NLS-LacZ/SeV of Example 1 was diluted with PBS to 1x 10<sup>8</sup> pfu/ml, and was dispensed into a 96-well round bottom plate at 50  $\mu$ l per well. The HN-1 purified by the method of Example 12; the HN-1/F(ab')<sub>2</sub> of Example 13; and the folic acid-bound HN-1 and folic acid-bound HN-1/F(ab')<sub>2</sub> of Example 14 were diluted with PBS to adjust their concentrations to 1 ~ 100  $\mu$ g protein/ml. 50  $\mu$ l of the diluted antibody solutions were respectively mixed with the vectors, and left standing at room temperature for 30 minutes to prepare modified vectors (Fig. 6). HAU was then measured by the method of Example 1.

Fig. 7 shows the results of the HAU measurements. In all of the modified SeV vectors, HAU decreased with the increase in the amount of added antibodies, becoming undetectable when the antibody concentration was 10  $\mu$ g protein/ml or higher. From



these results, it became possible to prepare a folic acid-bound antibody-modified SeV vector with a significantly reduced interaction with erythrocytes.

5 [Example 16] Hemolytic activity of folic acid-bound monoclonal antibody-modified SeV vector

The NLS-LacZ/SeV of Example 1 was diluted with PBS to  $1 \times 10^9$  pfu/ml, and dispensed into a 96-well round bottom plate at 50  $\mu$ l per well. The HN-1 purified by the method of Example 12, and the folic acid-bound HN-1 by Example 14, were diluted with 10 PBS to a concentration of 100  $\mu$ g protein/ml. Diluted solutions of antibodies or PBS (50  $\mu$ l each) were mixed with the vector, and left at standing at room temperature for 30 minutes to prepare modified vectors. Hemolytic activity was examined as 15 before, with the exceptions that the rat blood in the method of Example 4 was replaced with  $1 \times 10^9$  cells/ml of chicken blood, and the incubation time was changed to 30 minutes.

Fig. 8 shows the results of measuring hemolytic activity. The hemolytic activities of SeV vectors modified with HN-1 and 20 folic acid-bound HN-1 were extremely low, and when compared to SeV vector, hemolytic activity was even lower than the hemolytic activity of SeV vector at 1/100th of its concentration.

25 [Example 17] An *in vitro* gene introduction experiment for folic acid-bound monoclonal antibody-modified SeV vector

A modified vector was prepared by changing the titer of the SeV vector of Example 15 to  $1 \times 10^7$  pfu/ml, and the antibody concentration to 10  $\mu$ g/ml. On the day before the experiment, KB cells (derived from human rhinopharyngeal carcinoma) were plated 30 onto a 12-well plate at  $2 \times 10^5$  cells/well (in folic acid-free RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS: Gibco-BRL, 1 ml/well). One hour before the experiment, the medium was replaced with 0.5 ml of folic acid-free RPMI1640 medium or the same medium supplemented with 1 mM folic acid. 20  $\mu$ l of the above-described 35 vector were added to each well, and cells were infected at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Three hours later, the vector was

removed, cells were washed twice with the medium, and 2 ml of fresh medium was added to each well. Wells were then incubated for 48 hours at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. *LacZ* gene expression was measured as in Example 3.

Fig. 9 shows the results of *LacZ* gene expression in KB cells. Gene expression by the HN-1-modified SeV vector was 1/100 or less than that by the unmodified SeV vector, indicating a decrease in gene introduction with the loss of HAU. On the other hand, a significant increase in gene expression was observed for the folic acid-bound HN-1 compared to the HN-1 without folic acid, showing about 15% of the gene introduction of the unmodified SeV vector. Gene introduction using the folic acid-bound HN-1 was observed to be inhibited when excessive folic acid was present in the medium. This suggests that gene introduction by the folic acid-bound HN-1 occurs via the binding of folic acid, which is bound to HN-1 as a ligand, to the folic acid receptor of KB cells, followed by fusion mediated by F protein.

In Fig. 10 a comparison of when the antibody molecule was HN-1/F(ab')<sub>2</sub> was carried out. A high level of gene introduction was observed in HN-1/F(ab')<sub>2</sub> as well as in HN-1, only when folic acid bound to the antibody.

[Example 18] Preparation of folic acid-bound HN-1 by EDC method and assessment of the modified antibody

(1) Preparation of folic acid-bound HN-1 by EDC method

Preparation was by the method reported by Leamon et al. (Journal of Biological Chemistry, 1992, 267 (35), 24966-24971). That is, 21.7 mg/ml of 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC: Sigma) in dimethyl sulfoxide (DMSO) (1 ml) was added to 10 mg/ml folic acid (Sigma) in DMSO (1 ml). The mixture was then left to stand at room temperature in the dark for 30 minutes. This folic acid-EDC solution (16.6 µl) was added drop-wise while stirring to the HN-1 solution (300 µl) of Example 12, adjusted to a concentration of 1 mg protein/ml with PBS. The resulting mixture was reacted at room temperature in

the dark for one hour, and then folic acid-bound HN-1 was obtained as in Example 14-(2).

(2) HA activity of folic acid-bound HN-1-modified SeV vector

5 By replacing the folic acid-bound HN-1 of Example 15 with the folic acid-bound HN-1 of Example 18-(1), a modified vector was prepared and HAU was measured.

As shown in Fig. 11, the folic acid-bound HN-1 prepared by the EDC method was also effective in eliminating the HAU by  
10 modifying SeV vector.

(3) Gene expression by folic acid-bound HN-1-modified SeV vector

Modified vectors were prepared using a solution of SeV vector ( $1 \times 10^7$  pfu/ml) in Example 1, and HN-1 in Example 12 and  
15 folic acid-bound HN-1 in Example 18-(1) (both 100  $\mu$ g/ml). A549 cells (human lung carcinoma) were used in addition to the KB cells of Example 16, and the infection experiment was similarly carried out.

Table 4 compares the gene expression in KB cells, in which  
20 the folic acid receptor is expressed at a high level, and that in A549 cells practically devoid of this receptor (Wang et al., Bioconjugate Chemistry. 1997, 8, 673-679). The folic acid-bound HN-1-modified SeV vector showed a high level gene introduction in KB cells, but only in the absence of excessive folic acid.  
25 This indicated that the folic acid ligand that displaces the HN protein hemagglutinating activity mediates the introduction of specific genes by binding to folic acid receptors.

Table 4

30 Relative ratio of *LacZ* Gene Expression (where the SeV vector with excessive folic acid (-) is taken as 100%)

	Excessive Folic Acid	KB Cell	A549 Cell
SeV Vector	-	100.0 $\pm$ 10.9	100.0 $\pm$ 6.6
	+	107.7 $\pm$ 12.3	142.1 $\pm$ 13.3

HN-1-Modified SeV	-	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Vector			
Folic Acid-Bound HN-1	-	14.8 ± 1.3	3.2 ± 0.7
-Modified SeV Vector	+	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.6

[Example 19] Preparation and purification of GFP-carrying SeV vector

SeV/GFP carrying GFP gene was prepared by a known method (Kato et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579; Hasan et al., J. Gen. Virol., 1997, 78, 2813-2820). This vector was inoculated to 10-day-old embryonated hen eggs. After incubating at 35.3°C for three days, allantoic fluids were harvested and centrifuged at 4°C for 30 minutes at 3,000 rpm. The resulting supernatant was centrifuged at 4°C and 35,000 x g for one hour to precipitate the vector. The vector was resuspended in PBS and re-centrifuged at 4°C and 3,000 rpm for 30 minutes, and then the supernatant was centrifuged at 4°C and 35,000 x g for one hour to precipitate the vector. The vector was resuspended in PBS to prepare a stock solution of purified vector (hereinafter referred to as SeV vector). The protein concentration of the vector was measured with a BCA Protein assay (Pierce), using the vector solubilized with an equal volume of 3% Triton X-100 solution as a sample, and BSA as the standard. The concentration of the purified vector was about 1 mg protein/ml.

[Example 20] Preparation of SPA-PEG2K-modified SeV vector

Borate buffer (pH8.5) (0.5 ml) was added to the stock solution of SeV vector in Example 19 (0.5 ml) to prepare a solution of 0.5 mg protein/ml (pH8.5). 0, 2, 4, 6, 8, and 10 mg of succinimidyl derivative of PEG propionic acid reagent (MW: 2000) (SPA-PEG2K, Shearwater Polymers) was added in small amounts to the above-described solution while stirring. This solution was then reacted at room temperature for one hour. After the reaction was completed, the reaction solution was centrifuged at 4°C and 15,000 rpm for one hour. The resulting

precipitate was suspended in ice-cold PBS, and re-centrifuged at 4°C and 15,000 rpm for one hour to recover the vector, which was then re-suspended in PBS (0.5 ml) to obtain the SPA-PEG2K-modified SeV vector. The protein concentration of this modified  
 5 vector was determined as in Example 19.

[Example 21] Preparation of SPA-PEG5K-modified SeV vector

SPA-PEG5K-modified SeV was prepared and purified as in Example 20, after replacing the SPA-PEG2K in Example 20 with  
 10 SPA-PEG5K of MW: 5000 (Shearwater Polymers), and using PEG reaction amounts of 0, 5, 10, 15, 20, and 25 mg. The protein concentration of this modified vector was determined as in Example 19.

15 [Example 22] Preparation of PEG2NHS-10K-modified SeV vector

SPA-PEG5K-modified SeV was prepared and purified as in Example 20, after replacing the SPA-PEG2K in Example 20 with PEG2NHS-10K of MW: 10000 (two-branched; Shearwater Polymers), and using PEG reaction amounts of 0, 5, 10, 15, 20, and 25 mg.  
 20 Protein concentration of the modified vector was determined as in Example 19.

[Example 23] Hemagglutinating activity (HAU) and *in vitro* infectivity (CIU) of PEG-modified SeV vector

25 The hemagglutinating activity (HAU) and *in vitro* infectivity (CIU) of the PEG-modified SeV vectors set forth in Examples 20, 21, and 22 were examined. As shown in Figs. 12, 13, and 14, the HAU and CIU of the above-described three types of PEG-modified SeV vectors were measured, indicating a tendency  
 30 for reduced HAU and CIU with an increasing amount of PEG in reaction. The larger the molecular weight of PEG derivatives, the smaller the degree of reduction in HAU and CIU caused by increasing their reaction amounts. Furthermore, when the correlation between HAU and CIU was examined, the CIU per HAU for  
 35 SeV modified with an appropriate amount of SPA-PEG5K was about 7-8 times that of the unmodified vector. These results are

thought to show the possibility of maintaining infectivity by PEG modification, while reducing hamagglutination and improving the stability of SeV vector in blood.

HAU was determined as follows: Vector was serially diluted  
5 2-fold with PBS (50  $\mu$ l) using a 96-well round bottom plate (Asahi Technoglass). 50  $\mu$ l of a 1% solution of chicken erythrocytes, washed with PBS, was added to each well, and then left to stand at 4°C for one hour, whereupon hemagglutination was measured. HAU was expressed as the maximum dilution ratio  
10 to cause hemagglutination.

CIU was determined as follows: Vector was serially diluted  
10-fold with PBS / 1% BSA, and was then used to infect confluent LLC-MK2 cells in a 24-well plate at 10  $\mu$ l/well. Two days later, the number of GFP-expressing cells per well was counted to  
15 calculate CIU.

#### [Example 24] Confirmation of PEG modification

The PEG-modified SeV vectors described in Examples 20, 21, and 22 (0.5  $\mu$ g/lane) were subjected to SDS-PAGE analysis. As  
20 Fig. 15 shows, when the constituent proteins of viral vectors were analyzed by gel silver staining, the bands derived from envelope proteins F and HN decreased with increasing reaction amounts of PEG, and instead, bands appeared in higher molecular weight fractions. A smaller decrease in the amount of F protein  
25 compared to HN protein is likely to indicate that more HN proteins have been modified than F proteins. Furthermore, as Fig. 16 shows, when the F and HN proteins, the envelope proteins of the PEG-modified SeV vectors, were analyzed by Western blotting using rabbit anti-F1 polyclonal antibody and mouse  
30 anti-HN monoclonal antibody, the obtained results were similar to those obtained by silver staining analysis.

#### [Example 25] *In vitro* gene introduction by PEG2-NHS10K-modified SeV vector in the presence of neutralizing antibody

35 In line with Example 22, PEG2-NHS10K-modified SeV was obtained by reaction and purification, using reaction amounts of

0, 15, 20, and 25 mg of PEG. Protein concentration of the modified vector was determined as in Example 19. The vector solution was diluted with PBS / 1% BSA to a concentration of 0.01 µg/µl. The anti-SeV antiserum, prepared by immunizing rabbits (at 56°C for one hour) with SeV, was diluted 10-, 100-, and 1000-fold, and this or 35 µl of PBS / 1% BSA was added to 35 µl of the vector solution, and then reacted at room temperature for one hour. 20 µl of the above-described vector solution, which was treated with the antiserum, was added to each well of a 24-well plate of confluent LLC-MK2 cells, and infection was carried out. GFP expression on the third day after the infection was assessed by taking photographs using a fluorescence microscope, and a fluorescence plate reader was used to quantitatively assess GFP fluorescence intensity at fluorescence wavelength 530 nm and excitation wavelength 485 nm.

As shown in Fig. 17, the unmodified SeV vector showed a tendency for reduced infection efficiency with increasing antibody concentration, however, this decrease was suppressed by modifying the vector with PEG2-NHS10K. The infection efficiency was higher than that of the unmodified vector at all tested antibody concentrations, showing a maximum improvement in infection efficiency of about 70%.

[Example 26] *In vivo* gene introduction by PEG2-NHS10K-modified SeV vector

Mice were repeatedly administered with the unmodified SeV control vector prepared with 0mg of PEG, and the PEG-modified SeV vector prepared with a reaction amount of 20 mg of PEG, both prepared in Example 25. As shown in Figs. 18 and 19, mice were divided into five groups; for the first administration, a luciferase-carrying SeV was intranasally administered to mice to produce the anti-SeV antibody; and two weeks later, the second administration was performed using GFP-carrying unmodified SeV as a control in group B and PEG-modified SeV in group C, respectively. Group A served as the untreated control, and groups D and E as the single administration controls. Blood

samples were collected from mice prior to the first administration, one week after the first administration, and two weeks after the first administration to measure anti-SeV antibody titers using a commercially available ELISA kit (Prezyme "Seiken", Denka Seiken Co., Ltd.). In mice of groups B and C which had received the first administration, the elevation of the anti-SeV antibody titer was observed. On the day two weeks after the first administration when the antibody titer was sufficiently elevated, the second administration was performed. Two days later, mice were dissected, and GFP expression in lung was observed using a fluorescence microscope to take photographs.

As shown in the fluorescence photographs of Fig. 19, SeV infection was observed over a wide range, and no great differences between the unmodified and PEG-modified vectors were observed. In the second administration, the unmodified SeV showed almost no GFP expression from the full image, and even in the enlarged image, expression was only sparsely observed in portions of the lung surface. On the other hand, the PEG-modified SeV, although had a lower GFP expression than in the first administration, showed more GFP-expressing cells over a wider range compared to the unmodified SeV. As shown in the specifically enlarged image, colonies of GFP-expressing cells were observed.

[Example 27] Effects of maintaining infectivity of PEG-modified SeV at 4°C storage condition

PEG2NHS-20K-modified SeV and PEG2NHS-40K-modified SeV were prepared and purified in the similar fashion by respectively replacing SPA-PEG2K in Example 20 with PEG2NHS-20K of MW: 20000 (two-branched; Shearwater Polymers), using reaction amounts of 10, 20, and 40 mg of PEG; and replacing with PEG2NHS-40K of MW: 40000 (two-branched; Shearwater Polymers), using reaction amounts of 20, 40, and 80 mg of PEG. Protein concentrations of modified vectors were obtained as in Example 19.

CIUs of the above-described PEG-modified SeVs and the untreated SeV stored at 4°C for 8 and 20 days were measured



using the method in Example 5. As shown in Fig. 20, in the untreated SeV control, the titer decreased to 1/3 after two weeks of storage at 4°C, while SeVs modified with appropriate amounts of macromolecular two-branched PEGs retained a maximum infection efficiency of nearly 80%.

[Example 28] Improvement of infection efficiency of PEG-modified SeV by PEI modification

SPA-PEG5K-modified SeV vector prepared with reaction amounts of 0, 5, 10, and 15 mg of PEG in Example 21 was modified using polyethyleneimine of MW: 750000 (PEI; SIGMA), at the PEI:SeV weight ratio of 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, and 0.2 to measure the infection efficiency toward LLC-MK2 cells (see Example 23 for the measurement method). As shown in Fig. 21, adding a certain amount of PEI had the effect of increasing the infection efficiency of PEG-modified SeV about 10-fold. The greater the PEG modification, the better the improvement effect PEI has on infection efficiency. Similar results were also obtained using PEI of MW 25000 (Sigma).

#### Industrial Applicability

An important technical field in pharmacotherapy or gene therapy relates to systems for delivering biologically active substances, such as pharmaceuticals (macromolecular compounds, in particular) and nucleic acids, to target cells or intracellular organelle, namely, drug delivery systems (hereinafter, simply referred to as DDS). DDS can be implemented by using a viral vector, or by administering a composition in which a preferred biologically active substance is enclosed in or carried by an artificial or semi-artificial carrier. The present invention enables the reduction of hemagglutinating activity in both types of DDS, improving stability in blood and gene introduction efficiency. For example, in DDS that use a viral vector, a viral vector with specifically reduced hamagglutinating activity can be produced by applying this invention to a minus-strand RNA viral vector or

a pseudotyped viral vector derived from a gene of said virus encoding the envelope protein with hemagglutinating activity, or such. Furthermore, this invention enables the reduction of hemagglutinating activity also in the case of an artificial  
5 preparation of liposome and such. Compositions for DDS produced using this invention are extremely effective in *in vivo* application.

## CLAIMS

1. A pharmaceutical- or gene-carrier composition which comprises a cell membrane comprising a minus-strand RNA virus envelope protein with hemagglutinating activity, wherein:
  - (a) a compound is attached to the protein;
  - (b) the hemagglutinating activity is reduced compared to a composition to which the compound is not attached; and
  - (c) the composition comprises the ability to introduce a pharmaceutical or gene into a target cell.
2. The composition of claim 1, further wherein
  - (d) hemolytic activity toward erythrocytes is reduced compared to a composition to which the compound is not attached.
3. The composition of claim 1 or 2, which comprises an infective virion of the minus-strand RNA virus.
4. The composition of claim 1 or 2, which comprises an inactivated minus-strand RNA virus, or an envelope portion of the virus.
5. The composition of any one of claims 1 to 4, wherein the minus-strand RNA virus is a *Paramyxoviridae* family virus.
6. The composition of claim 5, wherein the *Paramyxoviridae* family virus is the Sendai virus.
7. The composition of any one of claims 1 to 6, wherein the compound attached to the protein has a molecular weight of 1,800 or more.
8. The composition of claim 7, wherein the compound attached to the protein has a molecular weight of 4,500 or more.

9. The composition of claim 8, wherein the compound attached to the protein has a molecular weight of 16,000 or more.
10. The composition of any one of claims 1 to 9, wherein the  
5 compound attached to the protein is polyethylene glycol.
11. The composition of any one of claims 1 to 10, wherein the protein further forms a complex with polyethyleneimine.
- 10 12. The composition of any one of claims 1 to 11, wherein the protein forms a complex with a cell-binding compound.
13. The composition of claim 12, wherein the cell-binding compound is bound to the compound attached to the protein.
- 15 14. The composition of claim 12 or 13, wherein the compound attached to the protein is an antibody that binds to the protein or fragment thereof.
- 20 15. The composition of any one of claims 12 to 14, wherein the cell-binding compound is a ligand for a receptor on the cell surface.
16. The composition of claim 15, wherein the ligand is folic  
25 acid.
17. An antibody bound to a cell-binding compound, wherein the antibody binds to a minus-strand RNA virus envelope protein comprising hemagglutinating activity, or a fragment thereof.
- 30 18. The antibody or fragment thereof of claim 17, which is  $F(ab')_2$ .
19. The antibody or fragment thereof of claim 17 or 18, wherein  
35 the cell-binding compound is a ligand for a receptor on a cell surface.

20. The antibody or fragment thereof of claim 19, wherein the ligand is folic acid.

- 5 21. A pharmaceutical- or gene-carrier kit which comprises:  
(a) an antibody or fragment thereof which binds to a minus-strand RNA virus envelope protein comprising hemagglutinating activity, and to which a cell-binding compound is bound; and  
(b) a pharmaceutical- or gene-carrier composition comprising the  
10 envelope protein.

## ABSTRACT

The present invention provides pharmaceutical- or gene-carrier compositions with reduced hemagglutinating activity. By  
5 attaching a compound to a minus-strand RNA virus envelope protein having hemagglutinating activity, a pharmaceutical- or gene-carrier composition with lower hemagglutinating activity than a composition to which the compound has not been attached can be successfully constructed. For example, an embodiment of  
10 the present invention provides a viral vector whose erythrocyte agglutination activity and hemolytic activity are significantly lowered, and whose stability in blood is remarkably elevated. The pharmaceutical- or gene-carrier compositions provided in this invention can be preferably used for transferring  
15 pharmaceuticals or genes *in vivo*.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

